EINFLUSS VON REDUZIERTEM GLUTATHION UND PROPYLTHIOURACIL AUF DIE INSULINSEKRETION DER RATTE

IN-VIVO-UNTERSUCHUNGEN ZUR PHARMAKOKINETIK DES GSH UND ZUR WIRKUNG DES GSH UND DES PROPYLTHIOURACILS AUF DIE GLUCOSETOLERANZ UND DIE FREISETZUNG DES INSULINS

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von
MATTHIAS C. M. MELIEN
aus Bielefeld

1984

LIBRARY

EINFLUSS VON REDUZIERTEM GLUTATHION UND PROPYLTHIOURACIL AUF DIE INSULINSEKRETION DER RATTE

IN-VIVO-UNTERSUCHUNGEN ZUR PHARMAKOKINETIK DES GSH UND ZUR WIRKUNG DES GSH UND DES PROPYLTHIOURACILS AUF DIE GLUCOSETOLERANZ UND DIE FREISETZUNG DES INSULINS

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von
MATTHIAS C. M. MELIEN
aus Bielefeld

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Januar 1984

Dekan: Prof. Dr. J. Strähle

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.P.T. Ammon

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Reinhard

Meinen Eltern

in Dankbarkeit

gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde im Dezember 1980 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im Juli 1983 abgeschlossen.

Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon
danke ich für die Überlassung des Themas, seine freundliche Unterstützung und sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. P. Bieck (Humanpharmakologisches Institut der Ciba-Geigy, Tübingen) danke ich für die Unterstützung bei der Berechnung der pharmakokinetischen Daten.

Weiter gilt mein herzlicher Dank allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Prof. Ammon für die ständige Diskussionsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

ABKÜRZUNGEN

cAMP	cyclisches Adenosin-3':5'-monophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve
t-BHP	tertiäres Butylhydroperoxid
Bo	Zählrate des Leerwertes
BSA	Rinderserumalbumin
Bx	Zählrate des Standards oder der Probe
C	Celsius
Cl(tot)	totale Plasmaclearance
p-CMB	para-Chloromercuribenzoat
p-CMBS	para-Chloromercuribenzolsulfonsäure
Cp	Plasmakonzentration
cpm	Counts pro Minute
Δ' (Delta)	Verteilungskoeffizient
DIP	Diazodicarbonsäure-bis-(N'methylpiperazid)
DIP(2+)	Dijodsalz des Diazodicarbonsäure-bis-(N'methyl-piperazid)
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)
E	Einheiten
GIT	Glutathion-Insulin-Transhydrogenase
GR	Glutathion-Reductase
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
gamma-GTP	gamma-Glutamyl-Transpeptidase
i.p.	intraperitoneal

i.v.	intravenös
IVGTT	intravenöser Glucosetoleranztest
k	Geschwindigkeitskonstante
KG	Körpergewicht
M	molar
min (')	Minuten
MMI	Methylmercaptoimidazol
MPA	Metaphosphorsäure
MTU	Methylthiouracil
NADP(+)	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert
n.s.	nicht signifikant
p	Probability
p.o.	per os
PPS	Pentosephosphatshunt
PTU	Propylthiouracil
r	Korrelationskoeffizient
RIA	Radioimmunoassay
SEM	Standard error of the mean
t1/2	Halbwertszeit
T3	3,5,3'-Trijodthyronin
T4	L-Thyroxin
U	Einheiten
Upm	Umdrehungen pro Minute
VD	scheinbares Verteilungsvolumen
Vp	Plasmavolumen

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	EINLEITUNG	1
1.1	Stand der Forschung	1
1.1.1	Der Mechanismus der Glucose-stimulierten Insulinsekretion	1
1.1.2	Die Rolle der intrazellulären Redoxsysteme bei der Aufnahme von Calcium und der Sekretion von Insulin	8
1.1.3	Der Metabolismus des Glutathions	12
1.2	Fragestellung	21
2	MATERIAL	25
2.1	Versuchstiere	25
2.2	Geräte	26
2.3	Chemikalien und Enzyme	27
2.4	Puffer- und Elektrolytlösungen	28
2.4.1	Imidazol-Puffer	28
2.4.2	Puffer für die Insulinbestimmung	28
2.4.3	Kaliumphosphatpuffer	28
2.4.4	Natriumphosphatpuffer	28
2.4.5	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung	29
3	METHODEN	30
3.1	Durchführung der Tierversuche	30
3.1.1	Präparation der Versuchstiere	30
3.1.2	Versuche zur Pharmakokinetik des Glutathions	32
3.1.2.1	Herstellung der Injektionslösung und Applikation	32
3.1.2.2	Abnahme der Blutproben	33
3.1.3	Infusion einer Glutathionlösung	33

3.1.3.1 Herstellung der Infusionslösung und Applikation 34

3.1.3.2 Abnahme der Blutproben 34

3.1.4 Intravenöse Glucosetoleranztests 34

3.1.4.1 Applikation der Glucose- und GSH-Lösungen 35

3.1.4.2 Abnahme der Blutproben bei alleiniger Bestimmung der Glucose 35

3.1.4.3 Abnahme der Blutproben zur Bestimmung des Glucose- und des Insulingehaltes im Plasma 35

3.1.5 GSH-Infusion und IVGTT 35

3.1.6 Gleichzeitige Infusion von Glucose und GSH 36

3.1.7 IVGTT nach Vorbehandlung mit Propylthiouracil 36

3.1.7.1 Applikation des Propylthiouracils 36

3.1.7.2 Durchführung des IVGTT 37

3.2 Bestimmung der Glutathionkonzentration und des Gesamtthiolgehaltes im Plasma 37

3.2.1 Beschreibung der Methode 37

3.2.2 Empfindlichkeit der Methode 39

3.2.3 Aufarbeitung der Blutproben für die Glutathionbestimmung 39

3.2.3.1 Fehlerquellen 39

3.2.3.2 Aufarbeitung zur Bestimmung der Glutathionkonzentration 41

3.2.3.3 Aufarbeitung zur Bestimmung der Glutathionkonzentration und des Gesamtthiolgehaltes 42

3.2.4 Durchführung der Messung 43

3.2.5 Bestimmung der Wiederfindung (Recovery) von GSH und GSSG 44

3.2.6 Messung des Gesamtthiolgehaltes 46

3.2.7 Auswertung der Glutathion- und Thiolmessungen 46

3.2.8 Berechnung der pharmakokinetischen Parameter 47

3.3 Bestimmung der Plasmaglucosekonzentration 48

3.3.1 Methode 48

3.3.2 Durchführung der Bestimmung 48

3.3.3 Auswertung der Glucosebestimmung 48

3.3.3.1 Berechnung des K-Wertes 48

3.3.3.2 Berechnung der Fläche unter der Plasmaglucosekurve 49

3.4 Insulinbestimmung 51

3.4.1 Eichkurven 51

3.4.1.1 Herstellung der Eichkurven 51

3.4.1.2 Einfluß des Glutathions auf den Verlauf der Eichkurven 51

3.4.2 Durchführung der Bestimmung 52

3.4.3 Auswertung der Bestimmung 54

3.4.3.1 Berechnung der Insulinwerte 54

3.4.3.2 Berechnung der Fläche unter der Plasmainsulinkurve 54

3.5 Statistik 56

4 ERGEBNISSE 57

4.1 Pharmakokinetik des Glutathions bei der Ratte 57

4.1.1 Vorversuche 57

4.1.2 Hauptversuche 60

4.1.3 Pharmakokinetische Parameter des reduzierten Glutathions 67

4.1.3.1 Pharmakokinetisches Modell 68

4.1.3.2 Plasmaspiegel zum Zeitpunkt 0 69

4.1.3.3 Halbwertszeiten 69

4.1.3.4 Geschwindigkeitskonstanten k13, k12 und k21 72

4.1.3.5 Volumen des zentralen Kompartiments 73

4.1.3.6 Verteilungsvolumen und Verteilungskoeffizient 73

4.1.3.7 Plasma-Clearance 73

4.1.4 Pharmakokinetik des oxidierten Glutathions 77

4.1.4.1 Halbwertszeiten 77

4.1.4.2 Geschwindigkeitskonstanten k13, k12 und k21 77

4.1.5 Glutathionplasmaspiegel bei GSH-Dauerinfusion 79

4.2 Einfluß von reduziertem Glutathion auf die Glucosetoleranz und die Insulinsekretion der Ratte in vivo 81

4.2.1 Intravenöse Glucosetoleranztests nach GSH-Bolusinjektion 81

4.2.1.1 Vorversuche: IVGTT ohne Bestimmung des Plasmainsulins 81

4.2.1.2 IVGTT mit Bestimmung des Plasmainsulins 87

4.2.3 GSH-Dauerinfusion 93

4.2.3.1 IVGTT in Kombination mit GSH-Infusion 93

4.2.3.2 Gleichzeitige Infusion von GSH und Glucose 96

4.3 Einfluß von Propylthiouracil auf die Glucosetoleranz und die Insulinsekretion der Ratte in vivo 99

4.3.1 Einfluß des PTU auf die basalen Plasmainsulin- und Plasmaglucosespiegel 99

4.3.2 Einfluß des PTU auf die Plasmainsulinspiegel nach intravenöser Glucosebelastung 100

4.3.3 Einfluß des PTU auf die Glucoseelimination nach intravenöser Glucosebelastung 101

5 DISKUSSION 105

5.1 Pharmakokinetische Eigenschaften des reduzierten Glutathions bei der Ratte 105

5.1.1 Glutathionplasmaspiegel der Ratte 105

5.1.2 Oxidation des reduzierten Glutathions im Plasma 107

5.1.3 Abbau des Glutathions in vivo 108

5.1.4 Pharmakokinetische Parameter des GSH bei der Ratte 109

5.2 Einfluß von reduziertem Glutathion auf die Insulinsekretion in vitro und in vivo 110

5.2.1 Effekte von reduziertem Glutathion auf Zellen verschiedener Gewebe 110

5.2.2 Unterschiede zwischen in-vitro- und in-vivo-Versuchen 112

5.2.2.1 Wirkspiegel des GSH an der Langerhans'schen Insel 112

5.2.2.2 Beschleunigung des Insulinabbaus durch GSH 113

5.2.2.3 Insulin-ähnliche Wirkung von Thiolen 115

5.3 Pharmakologische Effekte des Propylthiouracils in vitro und in vivo 117

5.3.1 Wirkungen an der Schilddrüse 117

5.3.2 Hepatoprotektive Wirkung des PTU 118

5.3.3 Effekte des PTU auf die Glucosetoleranz und die Insulinsekretion 120

5.3.3.1 Effekte bei chronischer Gabe von PTU 120

5.3.3.2 Akute Effekte des PTU auf die Insulinsekretion 122

6 ZUSAMMENFASSUNG 124

6.1 Zielsetzung 124

6.2 Ergebnisse 124

6.3 Schlußfolgerungen 125

7 LITERATURVERZEICHNIS 126

1 EINLEITUNG

1.1 Stand der Forschung

1.1.1 Der Mechanismus der Glucose-stimulierten Insulinsekretion

Der Prozeß der Glucose-stimulierten Insulinsekretion umfaßt

- die Erkennung des Stimulus durch einen Sensormechanismus
- metabolische und ionische Ereignisse in der B-Zelle
- Translokation der Speichergranula und Freisetzung des Insulins durch Exocytose.

Die Mehrzahl der Befunde deutet darauf hin, daß nicht Glucose selbst über einen Membranrezeptor den Sekretionsprozeß in Gang setzt ("regulator-site model"), sondern daß die Signale dazu aus dem Glucosemetabolismus in der B-Zelle stammen. Argumente für diese "substrate-site"-Hypothese sind: Nur solche Zucker, die in der B-Zelle verstoffwechselt werden können, wirken als primäre Stimulatoren. Neben Glucose sind dies Mannose (ASHCROFT & al., 1973) und N-Acetylglucosamin (WILLIAMS & ASHCROFT, 1978). In ähnlicher Weise wie Glucose stimuliert D-Glyceraldehyd, welcher nach Phosphorylierung auf der Stufe der Triosephosphate in die Glycolyse eintritt, die Insulinsekretion (HELLMAN & al., 1974a). Entsprechendes gilt für Inosin, welches nach Spaltung in Hypoxanthin und Ribose-1-P zu Glyceraldehyd-3-P metabolisiert wird (CAPITO & HEDESKOV, 1976). Isolierte Inseln sezernieren sogar im Glucose-freien Medium Insulin, wenn der glycolytische Abbau von endogenem Glycogen stimuliert wird (MALAISSE & al., 1977).

Nach ASHCROFT (1980) ist als Glucorezeptor das Enzym oder Transportsystem anzusehen, welches den Eintritt eines Zuckers in den B-Zellmetabolismus reguliert. Im Falle der Glucose kommt diese Rolle dem Enzym Glucokinase zu. Mannoheptulose, ein Inhibitor der Glucosephosphorylierung, hemmt die Sekretion von Insulin (MALAISSE & al., 1968).

Der Metabolismus der Glucose in der B-Zelle erfolgt im wesentlichen über zwei Stoffwechselwege: Glycolyse und Pentosephosphatweg (HEDESKOV, 1980). Der überwiegende Teil der in die B-Zelle aufgenommenen Glucose wird glycolytisch abgebaut. Vermutlich wird durch die Glycolyse die für den Transport der Insulinspeichergranula zur Plasmamembran benötigte Energie in Form von ATP bereitgestellt (MALAISSE & al., 1979).
Die Aktivität des Pentosephosphatshunts (PPS) Langerhans'scher Inseln steigt mit Zunahme der Glucosekonzentration (VERSPOHL & al., 1979). Der Glucoseabbau über den PPS dürfte zu dem Anstieg der Fluoreszenz reduzierter Pyridinnukleotide beitragen, den PANTEN & al. (1973) bei isolierten Inseln beobachtet haben, wenn die Glucosekonzentration im Perfusionsmedium von 5 auf 20 mM erhöht wurde.

Auf die zentrale Bedeutung der Calcium-Ionen für die Sekretion des Insulins wiesen GRODSKY & BENNETT (1966) hin. Der Anstieg der cytosolischen Ca(2+)-Konzentration wurde als "trigger" des Sekretionsmechanismus erkannt (MALAISSE, 1973). Die Ca(2+)-Konzentration im Cytosol wird über den Ein- und Ausstrom von Ca(2+) durch die Plasmamembran sowie über die Aufnahme in bzw. Freisetzung aus Zellorganellen, insbesondere Mitochondrien, reguliert.
Dem passiven Einstrom von Ca(2+) in die B-Zelle geht eine Änderung der

Permeabilität der Zellmembran voraus. Durch Hemmung des K(+)-Effluxes wird ein voltabhängiger Calciumkanal geöffnet, der den Calciuminflux ermöglicht (MATTHEWS & SAKAMOTO, 1975; MEISSNER, 1976; HENQUIN, 1977, 1978; HENQUIN & MEISSNER, 1978). Nach neuen Untersuchungen zeigt die durch Glucose stimulierte Depolarisation der B-Zellmembran einen biphasischen Verlauf (SEHLIN & FREINKEL, 1983).

Der Redoxstatus von Membran-SH-Gruppen scheint für diese transmembranären Ionenfluxe von Bedeutung zu sein. Hier liegt ein möglicher Verknüpfungspunkt zwischen dem Glucosemetabolimus, der u.a. zu einer Zunahme von reduzierten Pyridinnukleotiden führt, und dem Membranpotential der B-Zelle (HENQUIN, 1980) sowie dem Einstrom von Ca(2+) (HELLMAN & al., 1974b, 1980). Eine detaillierte Darstellung der Befunde zu den Beziehungen zwischen intrazellulären Redoxpaaren, Membranthio- len und Kationenfluxen folgt in 1.1.2.

Eine Beeinflussung der intrazellulären Verteilung von Ca(2+) durch Phosphoenolpyruvat (PEP), einen Metaboliten aus dem glycolytischen Glucoseabbau, wurde von SUGDEN & ASHCROFT (1978) gefunden: PEP hemmt die Calciumaufnahme in die Mitochondrien und trägt damit zum Anstieg der cytosolischen Ca(2+)-Konzentration bei.

Folgendes Modell nach ASHCROFT (1980) veranschaulicht die Stoffwechselereignisse, die zur "stimulus-secretion coupling" in der B-Zelle führen:

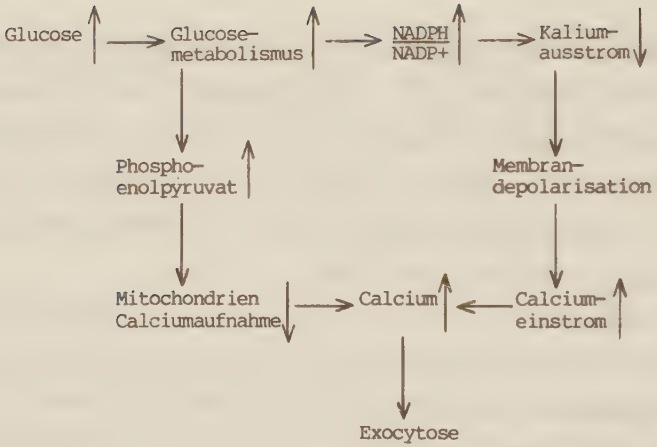

Abb.1.1:
Schematische Darstellung der möglichen regulatorischen Ereignisse bei der durch Glucose induzierten Insulinsekretion. Nach ASHCROFT (1980) führt die Steigerung der Glucosekonzentration über zwei Wege zur Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration:
1. über die Steigerung des Phosphoenolpyruvats und Hemmung der Calciumaufnahme in die Mitochondrien und
2. über eine vermehrte Calciumaufnahme durch die Cytoplasmamembran nach deren Depolarisation.

Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) wurde als ein potenzierendes Signal für die Insulinsekretion identifiziert (MALAISSE & al., 1967; MONTAGUE & COOK, 1971). Perifusion mit 16,7 mM Glucose führt zu einem 2,5-fachen Anstieg des cAMP-Levels isolierter Inseln (CHARLES & al., 1973). Ähnlich wie die Insulinsekretion zeigt die Zunahme des cAMP einen biphasischen Verlauf und erfordert die Anwesenheit von extrazellulärem Calcium (ZAWALICH & al., 1975).

Über die Beeinflussung der am cAMP-System beteiligten Enzyme Adenylatcyclase und Phosphodiesterase können Hormone (Glucagon, Prostaglandine, Secretin) und Pharmaka (ß-Adrenergika, Methylxanthine) modulie-

rend oder potenzierend auf die Insulinsekretion einwirken (KUO & al., 1974).

Ein Effekt des cAMP in Langerhans'schen Inseln besteht in der Phosphorylierung von Proteinen durch Aktivierung einer cAMP-abhängigen Proteinkinase (SUGDEN & al., 1979a), ein anderer in der Freisetzung von Ca(2+) aus Zellorganellen (BRISSON & al., 1973; HAHN & al., 1980).

Als intrazellulärer Calciumrezeptor konnte in Inselzellen das Ca-abhängige Regulatorprotein Calmodulin nachgewiesen werden (SUGDEN & al., 1979b). Die Bedeutung des Calmodulins für die Insulinsekretion wurde durch Versuche mit Calmodulin-Inhibitoren bewiesen: Durch das Phenothiazinderivat Trifluoperazin wird die durch Glucose (KRAUSZ & al., 1980; VALVERDE & al., 1981), Leucin (GAGLIARDINO & al., 1980) und Tolbutamid (HENQUIN, 1981) stimulierte Insulinsekretion gehemmt.

Die Wirkung des Calcium-Calmodulinkomplexes in der B-Zelle besteht zum einen in der Beeinflussung des Stoffwechsels cyclischer Nukleotide: Sowohl eine durch Calmodulin aktivierbare Adenylatcyclase (VALVERDE & al., 1979) als auch eine Calmodulin-abhängige Phosphodiesterase (SUGDEN & ASHCROFT, 1981) konnten in Pankreasinseln nachgewiesen werden. Zum zweiten ist Calmodulin an der Phosphorylierung endogener Proteine beteiligt (GAGLIARDINO & al., 1980; SCHUBART & al., 1980).

Die Phosphorylierung von Proteinen in der Langerhans'schen Insel wird demzufolge von zwei Enzymen katalysiert: von einer cAMP-abhängigen und von einer Ca-Calmodulin-abhängigen (cAMP-unabhängigen) Proteinkinase, welche einerseits unter verschiedenen stimulatorischen Bedingungen aktiviert werden, andererseits aber möglicherweise auch synergistisch wirken können (TOMLINSON & al., 1982).

Neben der Stimulation der Proteinphosphorylierung wird ein Einfluß des Ca-Calmodulins auf das Mikrotubulus/Mikrofilament-System diskutiert. Eine Beteiligung dieses Systems am Prozeß der Insulinsekretion wurde zuerst von LACY & al. (1968) vermutet.

Mikrotubuli werden während der Stimulation isolierter Inseln durch Glucose oder 3-Isobutyl-1-methylxanthin vermehrt gebildet (MONTAGUE & al., 1976). Substanzen, welche die Stabilität der Mikrotubuli beeinträchtigen, hemmen die Glucose-stimulierte Insulinsekretion (MALAISSE & al., 1971). Die Mikrotubuli sind möglicherweise für die Orientierung der Bewegung der B-Zellgranula zur Zellmembran (Margination) von Bedeutung, während die für diese Bewegung erforderliche Antriebskraft wahrscheinlich von den Mikrofilamenten geliefert wird (MALAISSE & al., 1972). Aktiver Bestandteil der Mikrofilamente in Pankreasinseln ist vermutlich ein Actin-Myosin-Komplex (HOWELL & TYHURST, 1981).

Nach Ansicht derselben Autoren ist eine Beeinflussung sowohl der Tubulinpolymerisation als auch der mikrofilamentären Kontraktion durch Ca-Calmodulin denkbar. Für letzteren Effekt wird folgender Mechanismus vorgeschlagen: Über die Aktivierung der Calmodulin-abhängigen Myosin-light-chain-Kinase kommt es zur Phosphorylierung des Myosins. Phosphoryliertes Myosin assoziiert mit filamentärem Actin zu Actomyosin, welches aufgrund seiner ATP-abhängigen kontraktilen Aktivität die Bewegung der Granula unterstützt (HOWELL & TYHURST, 1982).

In einem hypothetischen Modell haben HOWELL & TYHURST (1982) die möglichen Zusammenhänge zwischen Calcium, Tubulin, Actin und Myosin bei der Auslösung der Granulabewegung dargestellt:

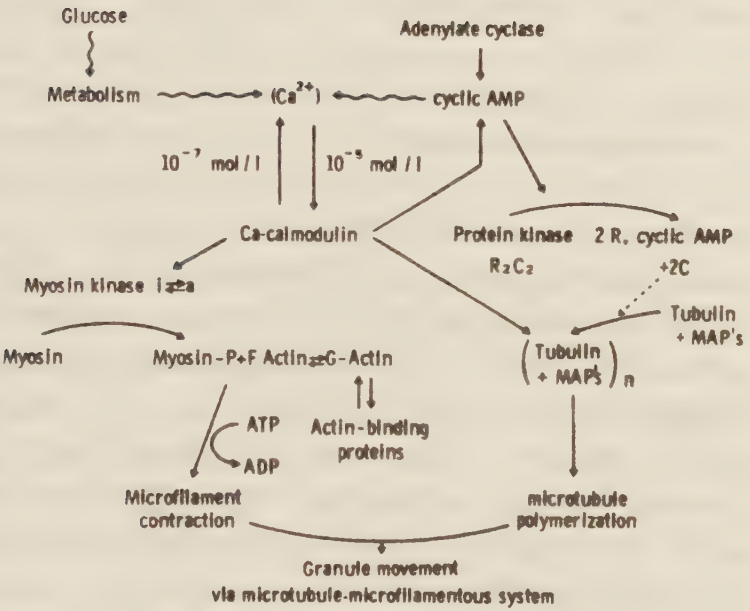

Abb.1.2:
Schematische Darstellung der Beziehungen zwischen dem Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration und der durch das Microtubulus/ Mikrofilamentsystem unterstützten Bewegung der B-Zellgranula.

Die Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration durch Glucose oder Stimulatoren des cAMP-Systems führt zur Bildung des Calcium-Calmodulinkomplexes. Dieser könnte u.a. folgendes bewirken:

1. Förderung der Tubulinpolymerisation, vielleicht in Verbindung mit einer verstärkten Phosphorylierung des Tubulins oder Mikrotubulusassoziierter Proteine (MAP's) durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase.

2. Phosphorylierung von Myosin über die Aktivierung einer Myosinkinase. Phosphoryliertes Myosin bildet zusammen mit filamentärem Actin Actomyosin, welches aufgrund seiner ATP-abhängigen kontraktilen Aktivität die Bewegung der Granula fördert. Als Folge der Kontraktion des Actomyosin bewegen sich die Granula möglicherweise entlang der durch polymerisierte Mikrotubuli vorgezeichneten Wege bis nahe an die Plasmamembran.
(aus: HOWELL & TYHURST, 1982)

1.1.2 Die Rolle intrazellulärer Redoxsysteme bei der Aufnahme von Calcium und der Sekretion von Insulin

Auf die Bedeutung reduzierter Pyridinnukleotide für die Insulinsekretion wurde man durch Studien mit 6-Aminonicotinamid aufmerksam: 6-AN, ein Antimetabolit der Pyridinnukleotidsynthese, hemmt die Glucose-induzierte Insulinsekretion (AMMON & STEINKE, 1972).

In Anwesenheit stimulatorischer Glucosekonzentrationen steigt der NADPH/NADP-Quotient, wie Messungen an ganzen Inseln (MALAISSE & al., 1978, 1979; AMMON & al., 1980) und im Cytosol ergaben (ASHCROFT & CHRISTIE, 1979). Eine ähnliche Wirkung hat Leucin allein und zusammen mit Glucose (AMMON & al., 1979a). Wird dagegen der Quotient durch exogenes Insulin oder Methylenblau, ein NADPH-Oxidans, erniedrigt, ist dies mit einer Hemmung der Glucose-stimulierten Insulinsekretion verbunden (AMMON & VERSPOHL, 1976, 1979).

Es erscheint jedoch zweifelhaft, daß das reduzierende Coenzym NADPH in der B-Zelle eine so spezifische Funktion wie die Kontrolle der Membranpermeabilität für K(+) und Ca(2+) innehat. Wahrscheinlicher ist die Beteiligung eines weiteren intrazellulären Redoxsystems, des Glutathionsystems, an diesem Mechanismus.

Oxidiertes Glutathion (GSSG) wird durch das NADPH-abhängige Enzym Glutathionreductase zu GSH reduziert. Glutathionreductaseaktivitäten wurden in Pankreasinseln nachgewiesen (AGREN & al., 1978; ANJANEYULU & al., 1982).

Glucose und Leucin zusammen mit Glucose steigern in Konzentrationen, in denen die Insulinsekretion stimuliert wird, den GSH/GSSG-Quotienten in Pankreasinseln (AMMON & al., 1980, 1981; ANJANEYULU & al., 1982). Die Erniedrigung des Quotienten durch exogenes Insulin hemmt die Se-

kretion isolierter Inseln bei Stimulation mit Tolbutamid und p-Chloromercuribenzoat (p-CMP) (AMMON & al., 1980). Ebenso beeinflussen Methylenblau und die Thioloxidantien Diamid und tert.-Butylhydroperoxid (t-BHP) den GSH/GSSG-Quotienten und die durch Glucose, p-CMP, Tolbutamid und Leucin + Glucose stimulierte Insulinsekretion negativ (AMMON & al., 1977, 1979 a+b).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Insulin-freisetzende Wirkung so unterschiedlicher Stimulatoren wie Glucose, Tolbutamid oder p-CMB vom GSH-Level der Langerhans'schen Insel abhängig ist. Von den genannten Substanzen steigert jedoch nur Glucose über ihren Metabolismus den GSH-Gehalt der Inseln, während p-CMB und Tolbutamid den Status der intrazellulären Redoxsysteme nicht beeinflussen (BLOOM & al., 1972; AMMON, 1975). Demzufolge ist intrazelluläres GSH kein Signal für die Sekretion des Insulins, wohl aber wird die Empfindlichkeit der B-Zelle gegenüber verschiedenen Stimulatoren durch den Grad der Reduktion des GSH/GSSG-Systems moduliert.

Intrazelluläres GSH ist vermutlich Hauptbestandteil des Thiolpools der B-Zelle, durch den SH-Gruppen der Membran, die für die "stimulus-secretion coupling" wichtig sind, in reduziertem Zustand erhalten werden. Aus Untersuchungen an Leberzellen (ISAACS & BINKLEY, 1977) und Erythrocyten (KOSOWER & al., 1982) ist eine enge Beziehung zwischen intrazellulärem GSH und Membranthiolgruppen bekannt.

SH-Gruppen der B-Zellmembran scheinen von Bedeutung zu sein für die Insulin-freisetzende Wirkung von Glucose (HELLMAN & al., 1974b; PAGLIARA & al., 1975), p-CMB (BLOOM & al., 1972), Disulfiden wie Dithiodinicotinsäure und DTNB (HELLMAN & al., 1973) und Sulfonylharnstoffen (HELLMAN & al., 1976).

AMMON und Mitarbeiter (1980) haben die geschilderten Zusammenhänge schematisch dargestellt (Abb.1.3):

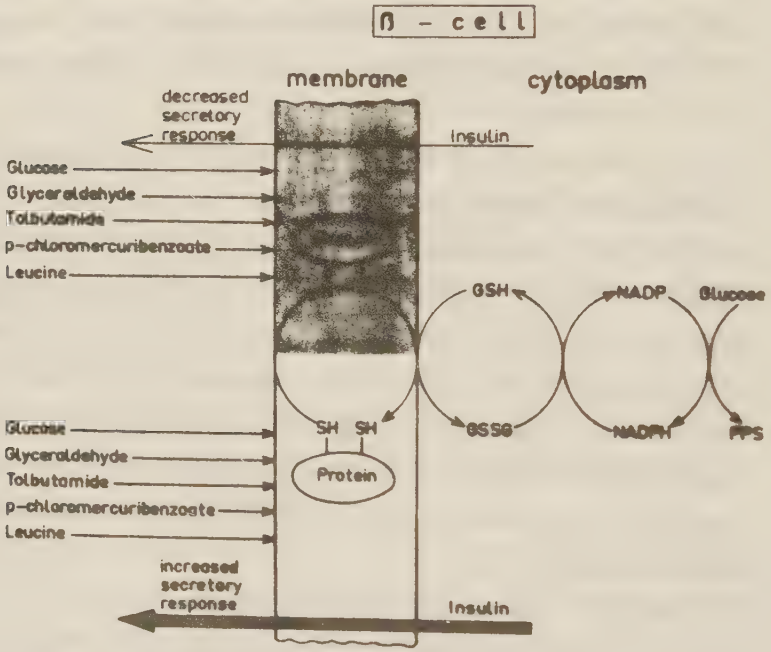

Abb.1.3:
Modell zur Rolle des Redoxstatus von Membranthiolen bei der Regulation der Insulinsekretion.
In diesem Schema wirken Glucose, Tolbutamid und p-CMB als Sekretionsstimuli auf die B-Zellmembran. Sind die Membranthiole, die möglicherweise am Stimulations-Sekretionsprozeß beteiligt sind, in reduziertem Zustand, führen die Stimuli zu einer gesteigerten Insulinsekretionsantwort. Liegen sie oxidiert vor, ist der Stimulationseffekt vermindert.
Dieser Redoxstatus wird möglicherweise durch folgende intrazelluläre Reaktionskette aufrechterhalten:
Glucoseoxidation über den Pentosephosphat Shunt —> NADPH —> GSH —> reduzierte Membranthiole.
(aus: AMMON & al., 1980)

Weitergehende Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von p-CMB und p-CMBS ergaben, daß die Stimulation der Insulinsekretion mit einer Steigerung der Calciumaufnahme korreliert ist (HELLMAN & al., 1975; ERLICHMAN & al., 1980). In unserem Labor wurde die Rolle der intrazellulären und der Membranthiole bei der Glucose-induzierten Calciumaufnahme und Insulinsekretion untersucht. Während durch das membrangängige Thioloxidans DIP die durch Glucose stimulierte Calciumaufnahme und die Insulinsekretion gehemmt werden, führt DIP(2+), welches nur mit Membran-SH-Gruppen reagiert, den intrazellulären GSH-Level jedoch nicht berührt, zu einer gesteigerten Aufnahme von Ca(2+) und Freisetzung von Insulin (AMMON & al., 1983).

In einer weiteren Studie wurde eine Vielzahl von Stimulatoren der Insulinsekretion daraufhin geprüft, inwieweit ihr Effekt durch exogenes GSH potenzierbar bzw. durch das Thioloxidans Diamid hemmbar ist. Es ergab sich, daß nur solche Stimulatoren thiolabhängig sind, von denen man weiß, daß sie zu einer Aufnahme von Calcium über den voltabhängigen Calciumkanal führen. Dies sind Glucose, Glyceraldehyd sowie Leucin und Tolbutamid (in Anwesenheit von 11,1 mM Glucose).
Anderseits wird die Stimulation der Insulinfreisetzung durch diejenigen Substanzen weder durch GSH gesteigert noch durch Diamid gehemmt, die Ca(2+) ionophorartig in die Zelle transportieren (Ionophor A 23187, Glibenclamid) oder das cAMP-System beeinflussen (Isoprenalin, di-Butyryl-cAMP) (AMMON & al., 1984a).

Diese Ergebnisse, zusammen mit dem Befund, daß die Glucose-stimulierte Calciumaufnahme durch exogenes GSH gesteigert wird (STRÖLIN, 1983), führen zu den folgenden Schlußfolgerungen:

1. Ein hoher Reduktionsgrad des intrazellulären GSH erhält die Membranthiolgruppen in reduziertem Zustand; dies ist eine Voraussetzung für die Glucose-stimulierte Ca(2+)-Aufnahme und die Sekretion von Insulin.
2. Oxidation oberflächlicher Thiole steigert die Calciumaufnahme und die Insulinfreisetzung.
3. Der Redoxzustand des intrazellulären Glutathionsystems scheint für die Schritte der "stimulus-secretion coupling", die der Calciumaufnahme folgen, nicht von Bedeutung zu sein.

1.1.3 Der Metabolismus des Glutathions

Glutathion, ein ubiquitäres Peptid mit der Konstitution L-gamma-Glutamyl-L-cysteinyl-L-glycin, ist das am weitesten verbreitete niedermolekulare Thiol. Es kommt in praktisch allen Zellen des Säugetierorganismus in Konzentrationen von 0,5 bis 10 mM vor. In extrazellulären Flüssigkeiten sind dagegen nur Glutathionmengen im Mikromolbereich nachweisbar.

Den aktuellen Stand der Kenntnisse über den Metabolismus des Glutathions haben MEISTER & ANDERSON in dem folgenden Schema zusammengefaßt (Abb.1.4):

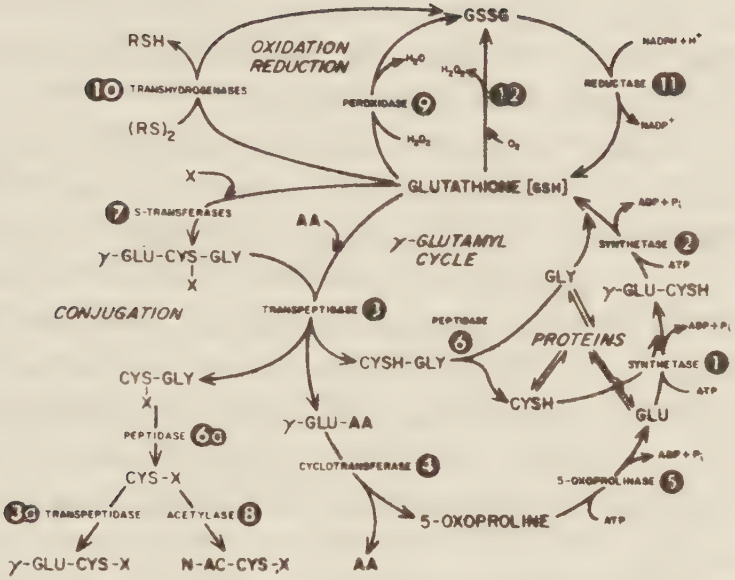

Abb.1.4:
Schematische Übersicht über den Metabolismus des Glutathions.
(aus: MEISTER & ANDERSON, 1983)

Die Ziffern bezeichnen einzelne Reaktionsschritte, die von den folgenden Enzymen katalysiert werden:

1. gamma-GLU-CYSH-Synthetase;
2. GSH-Synthetase;
3(a). Glutamyl-Transpeptidase;
4. gamma-Glutamyl-Cyclotransferase;
5. 5-Oxoprolinase;
6(a). Dipeptidase;
7. GSH-S-Transferasen;
8. N-Acetylase;
9. GSH-Peroxidase;
10. Transhydrogenasen;
11. GSSG-Reductase;
12. Oxidation von GSH durch O2.

Nähere Erläuterungen werden im Text gegeben.

A. Der gamma-Glutamyl-Zyklus

Das Kernstück des Schemas bildet der gamma-Glutamyl-Zyklus, der, von MEISTER & TATE (1976) formuliert, die sechs Reaktionsschritte der Synthese und des Abbaus des Glutathions beinhaltet:

Die Biosynthese beginnt mit der Reaktion der gamma-Carboxylgruppe des L-Glutamats mit der Aminogruppe des L-Cysteins. Diese ungewöhnliche Bindung verleiht dem Glutathionmolekül Resistenz gegenüber alpha-Peptidasen und schützt die Thiolgruppe vor rascher Oxidation. Die Anknüpfung des L-Glycins an das gamma-Glutamylcystein vervollständigt die Synthese. Beide Reaktionen sind ATP-abhängig und werden von den cytosolischen Enzymen gamma-Glutamylcystein-Synthetase bzw. GSH-Synthetase katalysiert (MEISTER, 1974), wobei erstgenanntes Enzym einer nichtallosterischen Feedbackhemmung durch GSH unterliegt (RICHMAN & MEISTER, 1975).

Der Glutathionabbau wird eingeleitet durch den Transfer der gamma-Glutamylgruppe auf bestimmte Akzeptorsubstrate (z.B. Aminosäuren), katalysiert durch das membranständige Enzym gamma-Glutamyl-Transpeptidase. Die Produkte dieser Reaktion, Cysteinylglycin und gamma-Glutamylaminosäuren, werden enzymatisch hydrolysiert. Peptidasen spalten Cysteinylglycin in Cystein und Glycin, aus den gamma-Glutamyl-Aminosäuren entstehen unter Einwirkung der gamma-Glutamyl-Cyclotransferase die freien Aminosäuren und 5-Oxo-L-prolin, welches durch 5-Oxo-prolinase in Glutamat übergeführt wird. Damit stehen die konstituierenden Aminosäuren für eine erneute Synthese des Glutathions zur Verfügung.

Nach Ansicht von MEISTER (1982) dient der geschilderte Zyklus als ein mögliches Transportsystem für bestimmte Aminosäuren.

B. Gamma-Glutamyl-Transpeptidase und GSH-Transport

Die gamma-Glutamyl-Transpeptidase (gamma-GTP) ist das einzige bisher bekannte Enzym, welches den Transfer der gamma-Glutamylgruppe katalysiert und damit den Glutathionabbau einleitet. Als gamma-Glutamyl-Donatoren fungieren GSH, GSSG und Glutathion-S-Konjugate, als Akzeptorsubstrate die Aminosäuren Cystein, Glutamat und Methionin sowie bestimmte Dipeptide (Transpeptidation), GSH selbst (Autotranspeptidation) und Wasser (Hydrolyse) (MEISTER & al., 1981).

Kontrovers wird zur Zeit die Frage diskutiert, welche der genannten Reaktionen von der gamma-GTP in vivo bevorzugt katalysiert wird. ALLISON & MEISTER (1981) sind der Meinung, daß in der Niere mindestens 50 % des GSH für die Transpeptidationsreaktion verwendet werden, während MCINTYRE & CURTHOYS (1980) die hydrolytische Freisetzung von Glutamat aus GSH als Hauptfunktion der renalen gamma-GTP ansehen.

Gamma-GTP-Aktivitäten finden sich vor allem in Membranen von Zellen mit sekretorischen oder absorptiven Funktionen: Epithelzellen der proximalen Nierentubuli, des Jejunums, des Gallentrakts, des Epididymis etc. (MEISTER & al., 1976). Von ANJANEYULU & al. (1981) wurde gamma-GTP auch in Langerhans'schen Inseln von Ratten nachgewiesen.

Schwer verständlich erschien, warum das Enzym gamma-GTP überwiegend auf der äußeren Oberfläche von Zellmembranen gebunden ist, während sein Substrat Glutathion intrazellulär in wesentlich höherer Konzentration vorliegt als im extrazellulären Raum.

GRIFFITH & al. (1978) konnten anhand von in-vivo-Versuchen an Mäusen erstmals zeigen, daß gamma-GTP intrazelluläres GSH als Substrat verwendet. Dem Abbau des intrazellulären Glutathions muß demzufolge der Transport zur membranständigen gamma-GTP vorausgehen. Eine solche Freisetzung von Glutathion (in reduzierter und oxidierter Form) ist

aus Zellen verschiedener Gewebe beobachtet worden: perfundierte Leber (BARTOLI & SIES, 1978), isolierte Hepatocyten (THOR & al., 1979; EKLÖW & al., 1981), isolierte Nierenzellen (ORMSTAD & al., 1980), Erythrocyten (SRIVASTAVA & BEUTLER, 1969) und Fibroblasten in Zellkultur (BANNAI & TSUKEDA, 1979).

Der Beweis, daß dieser GSH-Transport nur in einer Richtung (unidirektional) verläuft, wurde zumindestens für Leberzellen erbracht, die bei Perfusionsversuchen für exogenes GSH impermeabel waren (HAHN & OBERRAUCH, 1978).

GRIFFITH & al. (1979) fanden bei Studien an Lymphocyten-Zellinien mit unterschiedlichen gamma-GTP-Aktivitäten, daß die Translokation von intrazellulärem GSH nicht von der gamma-GTP-Aktivität der Zellen abhängig ist. Da die Freisetzung von intrazellulärem Glutathion demnach scheinbar eine allgemeine physiologische Funktion vieler Zellen des Säugetierorganismus ist, das Vorkommen der gamma-GTP jedoch auf nur wenige Gewebe begrenzt ist, besteht der folgende Zusammenhang zwischen der Translokation des Glutathions und seinem Metabolismus:

GSH, welches in Zellen mit hoher gamma-GTP-Aktivität synthetisiert wird, wird nach Translokation von der gamma-Glutamyl-Transpeptidase dieser Zellen utilisiert und die Produkte der Enzymreaktion reabsorbiert ("intra-organ cycle"), während GSH aus Zellen mit geringer oder fehlender gamma-GTP-Aktivität in das Blutplasma gelangt und auf diesem Wege zu solchen Zellen transportiert wird, die über gamma-Glutamyl-Transpeptidase verfügen. Den größten Anteil an diesem "inter-organ cycle" haben die Leber als GSH-freisetzendes und die Niere als GSH-utilisierendes Organ, jedoch auch andere Organe sind beteiligt (GRIFFITH & MEISTER, 1979a).

Der Inter-Organ-Kreislauf des GSH hat möglicherweise eine Bedeutung

für den Schutz von Zellmembranen vor oxidativer Beschädigung und für die Erhaltung essentieller SH-Gruppen der Membran.

C. Plasma-GSH und renaler GSH-Abbau

Durch Inhibitoren der GSH-Biosynthese wie Butathionsulfoximin wird sowohl die GSH-Gewebekonzentration als auch der GSH-Plasmaspiegel herabgesetzt. Andererseits führt die Hemmung der gamma-Glutamyl-Transpeptidase zu einem Anstieg des Plasma-GSH (GRIFFITH & MEISTER, 1979a). Diese Befunde sprechen für einen raschen, aktiven Umsatz des GSH-Plasmapools.

In Nierenzellen wird intrazelluläres GSH sehr schnell umgesetzt; die Halbwertszeit beträgt 30 Minuten (SEKURA & MEISTER, 1974). Innerhalb der verschiedenen Segmente des Nephrons haben die Zellen des proximalen Tubulus die höchste GSH-Konzentration (BREHE & al., 1976). Die Bürstensaummembran dieser Zellen verfügt zudem über eine hohe gamma-GTP-Aktivität (GLOSSMAN & NEVILLE, 1972). Das Enzym ist asymmetrisch an der luminalen Oberfläche der Membran orientiert (TSAO & CURTHOYS, 1980). Die Epithelzellen der proximalen Nierentubuli sind daher in der Lage, sowohl eigenes GSH, welches 80-90 % des GSH im Lumen ausmacht (GRIFFITH, 1981), als auch Plasma-GSH zu utilisieren.

Studien an anephrisch gemachten Ratten ergaben, daß ungefähr zwei Drittel des Plasma-GSH in der Niere utilisiert werden, während das verbleibende Drittel von extrarenaler gamma-GTP abgebaut wird (GRIFFITH & MEISTER, 1979b; HÄBERLE & al., 1979). Im Tierversuch kann durch Inhibitoren der gamma-Glutamyl-Transpeptidase Glutathionurie hervorgerufen werden (GRIFFITH & MEISTER, 1979b, 1980). Damit im Einklang stehen klinische Befunde, wonach bei einem Patienten mit nicht nachweisbarer gamma-GTP-Aktivität Glutathionurie und Glutathionämie beobachtet

wurden (SCHULMAN & al., 1975).

Bei einer Nierenpassage werden 80 - 90 % des Plasma-GSH extrahiert. Da die glomeruläre Filtrationsleistung nur etwa 20 - 30 % ausmacht, wird vermutet, daß die Niere einen zusätzlichen Mechanismus zur Entfernung des Plasma-GSH besitzt (HÄBERLE & al., 1979; ANDERSON & al., 1980). Die Extraktionsrate des GSH wird durch Applikation von Hemmstoffen der gamma-GTP signifikant erniedrigt, was auf eine Beteiligung der gamma-GTP an diesem Nicht-Filtrationsmechanismus schließen läßt (ANDERSON & al., 1980).

Zwei mögliche Erklärungen werden zur Zeit diskutiert: 1. Abbau des Plasma-GSH durch die von SPATER & al. (1982) kürzlich auf der basolateralen Membran der Tubuluszellen nachgewiesenen gamma-GTP ohne Aufnahme der konstituierenden Aminosäuren in die Zelle (BRIDGES & al., 1983). 2. Renale Extraktion des GSH durch ein für gamma-Glutamylverbindungen spezifisches paratubuläres Transportsystem (RANKIN & CURTHOYS, 1982; CURTHOYS & al., 1983).

Die Bürstensaummembran der proximalen Nierentubuli enthält außer der gamma-GTP das Enzym Aminopeptidase M, welches Cysteinylglycin und dessen S-substituierte Derivate hydrolysieren kann (HUGHEY & al., 1978; RANKIN & al., 1980) sowie eine weitere Dipeptidase, welche Cystinyl-bis-glycin zu spalten vermag (MCINTYRE & CURTHOYS, 1982).

Damit verfügt die Bürstensaummembran über die Enzymausstattung zum kompletten Abbau des Glutathions in reduzierter und oxidierter Form sowie der Glutathion-S-Konjugate.

D. Oxidation des GSH zum Disulfid

Wie aus dem Schema (Abb.1.4) zu entnehmen ist, kann die Oxidation des GSH zum GSSG durch drei verschiedene Reaktionen erfolgen:

1. Bei der Reduktion von Wasserstoffperoxid und anderen Peroxiden durch GSH, katalysiert durch das intrazellulär lokalisierte Enzym Peroxidase.

2. Durch Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen, wie sie von verschiedenen Transhydrogenasen katalysiert werden. Hingewiesen sei an dieser Stelle besonders auf die GSH-Insulin-Transhydrogenase, auf die unter 5.2.2.2 näher eingegangen wird.

3. Durch Reaktion mit Sauerstoff und freien Radikalen.

Die dritte Reaktion soll im folgenden näher beschrieben werden: Bereits 1945 berichteten AMES & ELVEHJEM über eine rasche, sauerstoffabhängige Oxidation von GSH in Nierenhomogenaten. Neuere Untersuchungen an isolierten Nierenzellen bestätigten diese Befunde und zeigten ferner, daß sich der Oxidation ein schrittweiser Abbau des GSSG zum Cystin anschließt.

Die Oxidation verläuft nach folgender Stöchiometrie (JONES & al., 1979): $2\ GSH + O_2 \longrightarrow GSSG + H_2O_2$.

Weitere Untersuchungen brachten Hinweise, daß ein Kupfer-haltiges Protein der Plasmamembran für die GSH-Oxidase-Aktivität der Nierenzellen verantwortlich sein könnte (ORMSTAD & al., 1979). TATE & al. (1979) studierten das Vorkommen der GSH-Oxidase-Aktivität in verschiedenen Geweben und fanden eine weitgehend parallele Verteilung und Lokalisation von GSH-Oxidase und gamma-GTP. Da hochgereinigte gamma-Glutamyl-Transpeptidase eine Oxidase-Aktivität zeigte, und die Trennung der beiden Aktivitäten mißlang, wurde vermutet, daß die Oxidation des GSH eine Funktion der gamma-GTP ist (TATE & ORLANDO, 1979).

Der genaue Reaktionsmechanismus wurde von GRIFFITH & TATE (1980) aufgeklärt: Katalysiert durch die gamma-GTP entsteht aus GSH Cysteinylglycin, welches durch Sauerstoff sehr rasch zu Cystinyl-bis-glycin

oxidiert wird. Cystinyl-bis-glycin oxidiert seinerseits GSH durch nichtenzymatische Wasserstoffübertragung zu GSSG. Das folgende Schema veranschaulicht diesen Mechanismus:

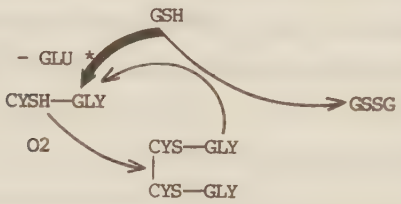

Abb.1.5:
Mechanismus der Oxidation von GSH zu GSSG in Assoziation mit der gamma-Glutamyl-Transpeptidase. (nach MEISTER, 1981)
Der Abspaltung der Glutamylhälfte durch gamma-GTP (*) folgt die nichtenzymatische Oxidation des Cysteinylglycins und die nichtenzymatische Wasserstoffübertragung zwischen GSH und Cystinyl-bis-glycin.

Abgesehen von diesem nichtenzymatischen Mechanismus scheint die GSH-Oxidation in der Niere jedoch auch enzymatisch erfolgen zu können: Eine Sulphydryloxidase-Aktivität ist von der renalen gamma-GTP abgetrennt und charakterisiert worden (ASHKAR & al., 1981; ORMSTAD & al., 1981). Diese renale Thioloxidase, die GSH als Substrat verwendet, ist auf der basolateralen Plasmamembran des Tubulusepithels lokalisiert (ORMSTAD & ORRENIUS, 1980; LASH & JONES, 1982).

E. Bildung von S-substituierten Derivaten des GSH

Schließlich sei erwähnt, daß GSH mit Substanzen, die ein elektrophiles Zentrum besitzen, spontan oder unter Katalyse von GSH-S-Transferasen S-substituierte Konjugate bildet. Zu diesen Substanzen zählen sowohl körpereigene Stoffe wie Leukotriene oder Prostaglandine als auch Xeno-

biotika.

Aus den Glutathion-S-Konjugaten entstehen durch Abspaltung von Glutamat und Glycin und Acetylierung der Aminogruppe des Cysteins die Mercaptursäuren.

1.2 Fragestellung

Unter 1.1.2 wurden zahlreiche Befunde beschrieben, die zu der Schlußfolgerung führten, daß der Redoxzustand ß-zellulärer Thiole die Empfindlichkeit der B-Zellen, mit der sie auf einen Glucosestimulus Insulin freisetzen, reguliert.

Aufgrund dieses Befundes eröffnet sich theoretisch die Möglichkeit, durch exogene Zufuhr von Stoffen, die Thiolgruppen besitzen, oder die die Verfügbarkeit ß-zellulärer Thiole auf direktem oder indirektem Wege erhöhen, die Ansprechbarkeit der Langerhans'schen Inseln auf eine Stimulation durch Glucose zu steigern. Es ist denkbar, daß derartige Thiolspender die Insulin-freisetzende Wirkung eines postprandial erhöhten Blutglucosespiegels unterstützen könnten und somit möglicherweise ein neuartiges Prinzip zur Behandlung einer B-Zellinsuffizienz, wie sie beim Typ-II-Diabetes vorliegt, darstellen würden.

Einige in-vitro-Untersuchungen scheinen diese Vermutung zu bestätigen. So wurde bei der Inkubation isolierter Inseln eine Potenzierung der Glucose-induzierten Insulinsekretion durch GSH beobachtet (HELLMAN & al., 1975a; AMMON & al., 1984a). Auch am isoliert-perfundierten Pankreas führte der Zusatz von GSH oder Cystein zum Perfusionsmedium zu

einer gesteigerten Insulinsekretion in Anwesenheit stimulatorischer Glucosekonzentrationen, während beide Thiole für sich allein die Insulinfreisetzung nicht erhöhten (AMMON & ABDEL HAMID, 1981).

Ähnliche Effekte zeigten Thioharnstoff und einige seiner Derivate, welche an der isolierten Insel die durch Glucose stimulierte Insulinsekretion dosisabhängig steigerten (AMMON & al., 1984b). Aufgrund der folgenden Tautomerie weisen Thioharnstoffverbindungen in wässrigen Lösungen eine partielle Thiolstruktur auf und können demzufolge auch als Thiole angesehen werden:

Die vorliegende Doktorarbeit hat zum Ziel, zu prüfen, ob die in-vitro-Effekte der genannten Substanzen auf die Sekretion des Insulins auch am Ganztier nachgewiesen werden können.

Voraussetzung für derartige in-vivo-Versuche ist, daß beim Versuchstier Wirkspiegel der betreffenden Substanzen erzeugt werden können, die in etwa den am isolierten Organ wirksamen Konzentrationen entsprechen. Entscheidend für die auftretenden Wirkspiegel ist die Art der Applikation und die Dosierung. Für ihre Wahl sind Kenntnisse des pharmakokinetischen Verhaltens der zu untersuchenden Stoffe, wie zum Beispiel ihre Resorption, Halbwertszeit, Ausscheidung etc., erforderlich.

Aus dem Gesagten ergeben sich für diese Arbeit die folgenden Fragestellungen:

1. Es soll der Verlauf der Plasmaspiegel des reduzierten Glutathions und seiner Metaboliten nach i.v.-Applikation von GSH bei der Ratte gemessen werden. Diese Untersuchungen dienen zum einen der Auffindung solcher GSH-Dosen, nach deren intravenöser Verabreichung GSH-Plasmakonzentrationen zwischen 0,1 und 1 mM resultieren. In diesem Bereich wird in vitro die Glucose-stimulierte Insulinsekretion durch GSH potenziert. Darüberhinaus geben die erhaltenen Plasmaspiegeldaten Auskunft über das Ausmaß der Oxidation und den Abbau des GSH im Plasma und ermöglichen die Berechnung pharmakokinetischer Parameter des reduzierten Glutathions.
Pharmakokinetische Daten des GSH sind unseres Wissens an Ratten noch nicht ermittelt worden, ihre Kenntnis könnte jedoch ganz allgemein für solche pharmakologischen Versuche von Interesse sein, bei denen GSH intravenös injiziert wird. So wurde beispielsweise über einen protektiven Effekt von i.v. appliziertem GSH gegenüber der durch Paracetamol ausgelösten Lebernekrose (WENDEL & al., 1982) oder über eine Verbesserung der Gewebepenetration eines Antibiotikums durch gleichzeitige i.v.-Verabreichung von reduziertem Glutathion berichtet (LESZCZYNSKA, 1981).

2. Im zweiten Teil der Arbeit soll untersucht werden, ob es möglich ist, die in vitro gefundene Potenzierung der Glucose-induzierten Insulinsekretion durch GSH auch am Ganztier nachzuweisen. Als Parameter für eine Beeinflussung der Insulinsekretion werden die Geschwindigkeitsraten der Glucoseelimination (K-Werte) und die Plasmainsulinkonzentrationen nach intravenöser Glucosebelastung gemessen.

3. Der dritte Teil der Arbeit wird in dem Versuch bestehen, die Steigerung der Glucose-stimulierten Insulinfreisetzung durch Propylthiouracil, welches sich von den in vitro getesteten Thioharnstoffderivaten am wirksamsten erwiesen hatte, auch im in-vivo-Experiment zu zeigen.

Das pharmakokinetische Verhalten des als Thyreostatikum in die Therapie eingeführten Propylthiouracils in der Ratte ist beschrieben worden (SITAR & THORNHILL, 1972), sodaß Untersuchungen zu diesem Thema nicht erforderlich sind.

Vielmehr soll geprüft werden, ob Propylthiouracil in einer geeigneten Dosierung am Ganztier einen insulinotropen Effekt hat. Als Kriterien für einen Einfluß auf die Insulinsekretion werden wiederum die Glucosetoleranz und die Plasmainsulinkonzentrationen vor und nach intravenöser Glucoseinjektion herangezogen.

2 MATERIAL

2.1 Versuchstiere

Wistar-Ratten im Alter von 3 bis 5 Monaten und mit einem Körpergewicht von 180 bis 300 g wurden verwendet. Ihre Haltung erfolgte in einem temperaturkontrollierten Raum (24 °C) unter Einhaltung eines 12-Stunden-Tag/Nacht-Rhythmus. Die Tiere erhielten Standardtrockenfutter der Firma Altromin, Lage/ Lippe und Trinkwasser ad libitum.

Für die Versuche zur Pharmakokinetik des Glutathions wurden Ratten beiderlei Geschlechts verwendet.

Zur Durchführung der Glucosetoleranztests wurden nur weibliche Ratten genommen, um eine geschlechtsbedingte Variabilität in den Versuchsergebnissen zu vermeiden (vgl.4.2.1.1).

Den für diese Tests verwendeten Tieren wurde 16 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter entzogen.

Alle Versuche wurden in der Zeit von 8.00 bis 15.00 Uhr durchgeführt.

2.2 Geräte

gamma-Counter System Gamma 310	Beckman
Glucose Analyzer 2	Instruments
Digital-pH-Meter Mod. 3560	GmbH, München
Spektralphotometer PM6	Carl Zeiss,
mit Drucker XP2	Oberkochen
Gefriertrocknungsanlage Beta	Christ
Kühlzentrifuge Cryofuge 20-3	GmbH,
Tischzentrifuge Microfuge HC 102	Osterode
Thermostat 3520	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Operationstisch für Ratten, beheizbar	
Beatmungspumpe (nach STARLING)	Braun, Melsungen
Infusionspumpe Precidor Typ 5003	Infors AG, Basel
Tischcomputer P602	Olivetti AG

2.3 Chemikalien und Enzyme

Aktivkohle Norit A	Serva, Heidelberg
DTNB (ELLMAN's Reagens)	Boehringer, Mannheim
alpha-D-Glucose	Serva, Heidelberg
Glucose Reagent Kit	Beckman, München
Glutathion, oxidiert	
Glutathion, reduziert	Boehringer,
Glutathion-Reductase (EC 1.6.4.2)	Mannheim
Glyoxalase I (EC 4.4.1.5)	
Heparin-Natrium	Medac, Hamburg
Insulin Radioimmunoassay Kit	Isotopendienst
(INSIK)	West, Dreieich
Methylglyoxal	Fluka, Neu-Ulm
NADPH	Boehringer, Mannheim
Pentobarbital (Nembutal)	Serva, Heidelberg
6-n-Propyl-2-thiouracil	Sigma, St.Louis, USA
Ratteninsulin	Novo Lab., Kopenhagen
Rinderserumalbumin	Sigma, St.Louis, USA

Alle anderen, hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt in der jeweils reinsten Form (p.a.) bezogen.

2.4 Puffer- und Elektrolytlösungen

2.4.1 Imidazol-Puffer (pH 7,2)

Imidazol	3,06 g
Titriplex III	0,37 g
Salzsäure 0,1 N	100,0 ml
Aqua bidest. ad	1000,0 ml

2.4.2 Puffer für die Insulinbestimmung (pH 7,4)

$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	10,60 g
Titriplex III	3,72 g
BSA	1,00 g
Aqua bidest. ad	1000,0 ml

2.4.3 Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,5)

KH_2PO_4	3,32 g
$K_2HPO_4 \times 3\ H_2O$	28,76 g
Aqua bidest. ad	1000,0 ml

2.4.4 Natriumphosphat-Puffer (pH 7,2)

$NaH_2PO_4 \times H_2O$	5,52 g
$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	19,58 g
Titriplex III	5,58 g
Aqua bidest. ad	1000,0 ml

2.4.5 Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung (UMBREIT & al., 1972)

Zusammensetzung:

NaCl-Lösung	0,90 % = 154 mM	100 Teile
KCl-Lösung	1,15 % = 154 mM	4 Teile
$CaCl_2$-Lösung	1,22 % = 110 mM	3 Teile
KH_2PO_4-Lösung	2,11 % = 154 mM	1 Teil
$MgSO_4$-Lösung	3,82 % = 154 mM	1 Teil
$NaHCO_3$-Lösung	1,30 % = 154 mM	21 Teile

Um diese Lösung jederzeit frisch bereiten zu können, erwies es sich als praktisch, drei Stammlösungen folgender Zusammensetzung herzustellen:

Lösung A:	NaCl	69,20 g
	KCl	3,61 g
	KH_2PO_4	1,62 g
	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	2,93 g
	Aqua bidest.	ad 1000,0 ml
Lösung B:	$NaHCO_3$	21,10 g
	Aqua bidest.	ad 1000,0 ml
Lösung C:	$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	3,73 g
	Aqua bidest.	ad 1000,0 ml

Zum Gebrauch wurde folgende Mischung hergestellt:

Lösung A	1 Teil
Lösung B	1 Teil
Lösung C	1 Teil
Aqua bidest.	7 Teile.

3 METHODEN

3.1 Durchführung der Tierversuche

Um die Plasmakonzentrationen exogen zugeführter (Glutathion, Glucose) und endogen freigesetzter (Insulin) Substanzen verfolgen zu können, muß die Möglichkeit geschaffen werden, dem Versuchstier innerhalb kurzer Zeitabstände ausreichend große Blutprobenvolumina zu entnehmen. Ferner muß eine sichere intravasale Applikation gewährleistet sein. Deshalb werden am narkotisierten Versuchstier geeignete Blutgefäße zur intravenösen Injektion und zur Blutprobenentnahme freipräpariert. Zur Durchführung der pharmakokinetischen Messungen, der intravenösen Glucosetoleranztests und der Infusionsversuche wurde die rechte Vena jugularis externa für die Applikation und die linke Arteria carotis zur Blutentnahme unter Anwendung der nachfolgend beschriebenen Präparationstechnik dargestellt.

3.1.1 Präparation der Versuchstiere

Vor dem operativen Eingriff werden die Tiere gewogen, durch intraperitoneale Injektion von 50 mg Pentobarbital pro kg Körpergewicht narkotisiert und auf einem beheizten (34 °C) Operationstisch auf dem Rücken liegend fixiert.

In der Halsregion wird die Haut drei Zentimeter in Längsrichtung eingeschnitten. Das oberhalb des Sternum-Ansatzes gelegene Bindegewebe wird kopfwärts gezogen, sodaß die darunterliegenden Muskelschichten freigelegt werden.

Der Muskulus sternohyoideus wird entlang seiner Verlaufsrichtung mit

einer Pinzette aufgespalten. Durch den entstandenen, ein Zentimeter langen Spalt sind die Trachea und die Arteria carotis zugänglich.

Zunächst wird die Trachealkanüle gelegt, wodurch ein mögliches Ersticken des narkotisierten Tieres verhindert wird. Dazu wird die Trachea mit einem Faden angeschlungen, zwischen zwei Knorpelringen eingeschnitten und ein drei Zentimeter langer PVC-Schlauch (Durchmesser außen 1,9 mm, innen 1,3 mm) eingebunden.

Weiter wird auf der linken Seite die Arteria carotis aus dem umgebenden Bindegewebe gelöst, von den begleitenden Strängen des Nervus vagus unter größtmöglicher Vorsicht abgetrennt und mit zwei Fäden angeschlungen.

Schließlich wird die rechte Vena jugularis ext. vom Bindegewebe freipräpariert und ebenfalls zweifach angeschlungen. Dann wird das Gefäß mit einem Faden distal unterbunden und in proximaler Richtung angeschnitten. Als Venenkatheter wird ein fünf Zentimeter langer PVC-Schlauch (Durchmesser außen 0,8 mm, innen 0,4 mm) eingeführt und mit dem zweiten Faden fixiert.

Der Schlauch ist mit einer 1-ml-Spritze verbunden, welche das berechnete Volumen einer Heparin-Natrium-Lösung (5000 E/ml) enthält. Die Dosis beträgt 750 E pro 100 g Körpergewicht (siehe 3.2.2.1). 20 % der Heparinlösung werden sofort langsam injiziert.

Zur Katheterisierung der Arteria carotis wird ein PVC-Schlauch gleicher Stärke verwendet. Das Gefäß wird distal durch einen Faden und proximal mit einer Gefäßklemme unterbunden. Der abgeklemmte Abschnitt wird angeschnitten, der Katheter eingeschoben und fixiert. Nachdem der Schlauch am anderen Ende mit einer Klemme verschlossen worden ist, wird die Gefäßklemme entfernt. Durch Öffnen der Schlauchklemme kann tropfenweise arterielles Blut entnommen werden.

Zum Schutz vor Austrocknung wird das Präparat mit einem mit physiologischer Kochsalzlösung getränkten Mulltupfer abgedeckt.
Nach einer Äquilibrationszeit von 15 Minuten wird die restliche Heparinlösung injiziert.
Nach Beendigung der Versuche wurden die Tiere durch i.v.-Injektion einer Überdosis Pentobarbital getötet.

3.1.2 Versuche zur Pharmakokinetik des Glutathions

3.1.2.1 Herstellung der Injektionslösung und Applikation

Aufgrund der Instabilität des reduzierten Glutathions in Lösungen, insbesondere wegen seiner Oxidationsempfindlichkeit, wurden die Injektionslösungen unmittelbar vor der Applikation frisch hergestellt.
Dazu wird die jeweilige GSH-Dosis in soviel Aqua bidest. gelöst, daß eine blutisotonische Lösung entsteht. Das benötigte Volumen Wasser wird nach folgender Formel berechnet:

$$L = 1{,}86 \times m \times 1000 / M \times 0{,}52$$

(L = Menge dest. Wasser in ml, m = Einwaage in mg, M = Molekulargewicht).
Diese Lösung wird mit 0,9 %iger Natriumchlorid-Lösung auf ein Volumen von 1,00 ml gebracht (Tab.3.1). Die Blutisotonie einer so hergestellten Injektionslösung wurde am Osmometer überprüft.

Nach kurzem Mischen wird ein dem Körpergewicht des Versuchstieres entsprechendes Volumen (z.B. 250 µl bei einer 250 g schweren Ratte) in eine 1-ml-Spritze einpipettiert. Die Spritze wird mit dem Venenkatheter verbunden und die GSH-Lösung rasch injiziert. Schlauch und Spritze werden im Anschluß mit 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung nachgespült.

Tab.3.1: Herstellung isotonischer GSH-Injektionslösungen.

GSH-Dosis <µmol>	= <mg>	Aqua bidest. <µl>	NaCl-Lsg. 0,9% <µl>
25	7,7	90	910
50	15,4	180	820
100	30,7	360	640
200	61,4	720	280
300	92,1	1000	-

Der GSSG-Gehalt der GSH-Injektionslösungen wurde stichprobenartig bestimmt. Oxidiertes Glutathion ist als Verunreinigung in dem verwendeten GSH enthalten (nach Angaben des Herstellers 1 % GSSG) und entsteht außerdem durch Oxidation des GSH während des Lösungsvorganges. Die untersuchten Injektionslösungen enthielten im Mittel 7,3 % GSSG.

3.1.2.2 Abnahme der Blutproben

Vor sowie 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20 und 30 Minuten nach Injektion der GSH-Lösung wird jeweils eine Blutprobe mit einem Volumen von 100 bzw. 200 µl abgenommen. Das Blut wird in eisgekühlten 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangen. Die weitere Aufarbeitung der Proben wird unter Punkt 3.2.3 beschrieben.

3.1.3 Infusion einer Glutathionlösung

Um das Verhalten des reduzierten Glutathions bei kontinuierlicher intravenöser Applikation zu studieren, werden GSH-Lösungen mit einer

Infusionspumpe in die Vena jugularis infundiert.

3.1.3.1 Herstellung der Infusionslösung und Applikation

Es werden unmittelbar vor Beginn der Infusion 15,4 bzw. 30,7 mg (= 50 bzw. 100 µmol) GSH in 10,00 ml Krebs-Ringer-Lösung gelöst, deren pH-Wert vorher auf 7,4 eingestellt worden ist. Diese 5- bzw. 10-mmolaren Lösungen werden mit einer 10-ml-Plastikspritze aufgezogen. Durch geeignete Einstellung des Kolbenvorschubs der Pumpe wird eine Infusionsgeschwindigkeit von 75 µl pro Minute gewählt. Bei dieser Infusionsgeschwindigkeit ist die Flüssigkeitsbilanz ausgeglichen, da pro Zeiteinheit annähernd gleiche Volumina an physiologischer Elektrolytlösung infundiert und als Blutproben entnommen werden.

3.1.3.2 Abnahme der Blutproben

Blutproben werden vor Beginn der Infusion sowie in Abständen von 5 Minuten bis 60 Minuten nach Infusionsbeginn entnommen und wie unter 3.2.3.3 beschrieben aufgearbeitet.

3.1.4 Intravenöse Glucosetoleranztests (IVGTT)

Im Gegensatz zu den oben geschilderten Versuchen werden die Versuchstiere während der Durchführung der IVGTT nach Abschluß der Operation an eine Beatmungspumpe angeschlossen. Dazu wird die Trachealkanüle gegen das Ansatzstück der Pumpe ausgetauscht. Durch diese Maßnahme soll verhindert werden, daß die Tiere während des einstündigen Versuchs infolge einer mit Bronchialsekret verstopften Trachealkanünle ersticken. Eine Hypersekretion der Bronchien wurde gelegentlich beobachtet und ist wahrscheinlich als eine Nebenwirkung des Narkotikums Pentobarbital anzusehen.

3.1.4.1 Applikation der Glucose- und GSH-Lösungen

alpha-D-Glucose wird bei einer Dosierung von 0,25 g/kg als 25 %ige (G/V) und bei einer Dosierung von 0,5 und 1,0 g/kg als 50 %ige (G/V) Lösung langsam, d.h. über einen Zeitraum von 30 Sekunden injiziert. Anschließend werden Spritze und Katheter mit 0,2 ml NaCl-Lösung nachgespült.

Die nach 3.1.2.1 hergestellten GSH-Lösungen werden in Abhängigkeit von der Dosis 10, 5, 2 oder 1 Minute vor der Glucoseinjektion verabreicht. Die Kontrolltiere erhalten zum entsprechenden Zeitpunkt das gleiche Volumen einer 0,9 %igen Natriumchloridlösung.

3.1.4.2 Abnahme der Blutproben bei alleiniger Bestimmung der Glucose

15 und 10 bzw. 10 und 5 Minuten vor und 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 und 40 Minuten nach der Glucoseinjektion werden jeweils 50 µl Blut in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen.

3.1.4.3 Abnahme der Blutproben zur Bestimmung des Glucose- und des Insulingehalts im Plasma

Bedingt durch den großen Plasmabedarf für die Insulinbestimmung wird die Durchführung des IVGTT gegenüber 3.1.3.2 in drei Punkten abgewandelt. Blutproben mit einem Volumen von 300 µl werden 10 und 5 Minuten vor sowie 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 und 40 Minuten nach Glucosegabe abgenommen. Zur Vermeidung von Kreislaufstörungen werden ferner nach jeder Abnahme 0,3 ml physiologische Kochsalzlösung zur Volumensubstitution injiziert.

3.1.5 GSH-Infusion und IVGTT

Um der Frage nachzugehen, ob GSH bei einem relativ konstanten

Blutspiegel (steady state) die Glucose-induzierte Insulinsekretion zu steigern vermag, wird dem Versuchstier zuerst eine GSH-Lösung infundiert und außerdem ein Glucosebolus intravenös appliziert.

Durchführung: Eine 10-mmolare GSH-Lösung (siehe 3.1.3.1) wird 20 Minuten mit einer Geschwindigkeit von 75 µl/min infundiert. Dann wird über einen Dreiwegehahn die Glucoselösung wie unter 3.1.4.1 beschrieben injiziert. Nach Abschluß der Glucoseinjektion wird die Glutathioninfusion bis zum Ende des Versuchs fortgesetzt. Den Kontrolltieren wird eine reine Krebs-Ringer-Lösung verabreicht.

Blutproben werden vor und nach der Glucosegabe in Abständen von fünf Minuten genommen.

3.1.6 Gleichzeitige Infusion von Glucose und GSH

Die Wirkung von GSH auf die durch kontinuierliche Glucosebelastung stimulierte Insulinsekretion sollte untersucht werden.

Dazu infundiert man eine blutisotonische 5 %ige (G/V) Glucoselösung mit einer Geschwindigkeit von wiederum 75 µl/min.

Nach einer Infusionsdauer von 15 Minuten wird bei den Versuchstieren die Glucoselösung gegen eine Lösung ausgetauscht, die außer 5 % Glucose auch GSH (10 mM) enthält. Die Kontrolltiere erhalten weiterhin 5 %ige Glucoselösung.

Blutproben werden in Zeitabständen von 5 Minuten entnommen und wie unter Punkt 3.3.2 geschildert weiterverarbeitet.

3.1.7 IVGTT nach Vorbehandlung mit Propylthiouracil

3.1.7.1 Applikation des Propylthiouracils

Wegen der geringen Wasserlöslichkeit des Propylthiouracils (1 Teil in 700 Teilen Wasser) ist eine intravenöse Applikation der Substanz nicht

möglich. Daher wird PTU in Wasser suspendiert und mit der Schlundsonde oral verabreicht. Die Dosierung beträgt 50, 100 oder 200 mg/kg Körpergewicht. Die Suspensionen werden so eingestellt, daß die für 1 kg Tiergewicht benötigten Mengen PTU in 10 ml enthalten sind. Den Kontrolltieren wird ein entsprechendes Volumen Wasser sondiert.

3.1.7.2 Durchführung des IVGTT

30 Minuten nach Applikation des PTU werden die Tiere narkotisiert und wie unter 3.1.1 geschildert präpariert.

65 und 70 Minuten nach PTU-Gabe wird je eine Blutprobe entnommen. Die Injektion des Glucosebolus (0,5 g/kg) erfolgt 75 Minuten nach Verabreichung des PTU. Blutproben werden von der 80. bis zur 120. Minute in Abständen von 5 Minuten entnommen.

3.2 Bestimmung der Glutathionkonzentration und des Gesamtthiolgehaltes im Plasma

3.2.1 Beschreibung der Methode

Zur Bestimmung des Gesamtthiolgehaltes und der Glutathionkonzentration wurde ein spektrophotometrisches Verfahren angewandt. Die Farbentwicklung beruht bei dieser von ELLMAN 1959 publizierten Methode auf der reduktiven Spaltung der Disulfid-Bindung der 5,5'-Dithio-bis(-2-nitrobenzoesäure) (= DTNB, ELLMAN's Reagens) durch reduzierte Thiole:

$$DSSD\ (= DTNB) + 2\ RSH \longrightarrow 2\ DSH + RSSR.$$

TIETZE (1969) entwickelte diese Methode zu einem empfindlichen und spezifischen Bestimmungsverfahren für Glutathion weiter, indem er das Enzym Glutathion-Reductase (GR) und dessen Coenzym NADPH hinzufügte.

Durch den Prozeß des "enzymatic cycling" wird oxidiertes Glutathion durch Katalyse der Glutathion-Reductase unter Verbrauch von NADPH ständig zu GSH reduziert und steht so für eine erneute Reaktion mit DTNB zur Verfügung:

Die Vorteile dieses kinetischen Tests sind:

1. Empfindlichkeit. Es werden nur kleine Blutprobenvolumina benötigt, sodaß der Kreislauf des Versuchstieres wenig belastet wird.

2. Spezifität. Die Spezifität der Bestimmung ist durch die hohe Spezifität des Enzyms Glutathion-Reductase gewährleistet (PHIL & al., 1957; CHANG & WILKEN, 1966; CARLBERG & MANNERVIK, 1975, 1977). Daher beeinflussen andere lösliche Thiole wie z.B. Cystein und Cysteinylglycin, welche als Metaboliten des intravenös applizierten GSH im Plasma erscheinen (s. 4.1.2), die Glutathionbestimmung nicht.

Durch den Zusatz des reduzierenden Enzyms werden sowohl die reduzierte als auch die oxidierte Form des Glutathions bestimmt. Zur Unterscheidung zwischen GSH und GSSG wird die Probe geteilt. Die eine Hälfte wird zur Bestimmung des Gesamtglutathions (GSH + 2 GSSG) eingesetzt, während in der zweiten Hälfte GSSG nach Maskierung des GSH separat gemessen werden kann.

Dazu wird GSH mit Methylglyoxal unter Katalyse des Enzyms Glyoxalase I zu S-Lactoyl-Glutathion umgesetzt. Nach dieser Reaktion ist die Sulfhydrylgruppe des GSH blockiert und kann demzufolge nicht mehr mit DTNB reagieren. Dieses auf HEINLE (1979) zurückgehende Verfahren erwies sich als gut geeignet für die Glutathionbestimmung im Plasma.

Durch Subtraktion des GSSG-Gehalts der Probe von der gefundenen Menge

an Gesamtglutathion läßt sich die GSH-Konzentration errechnen.

3.2.2 Empfindlichkeit der Methode

In einem Vorversuch wurde der Konzentrationsbereich ermittelt, in dem Glutathion mit der "enzymatic cycling"-Methode in der Modifikation von BREHE & BURCH (1976) bestimmt werden kann.

Dazu wurde im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 412 nm die Extinktionszunahme von Proben gemessen, die GSH in einem Konzentrationsbereich zwischen 0 und 1000 pmol pro Ansatz enthielten.

Die Zunahme der Extinktion war im Bereich von 10 bis 400 pmol GSH pro Ansatz linear (r = 0,999; Abb.3.1).

3.2.3 Aufarbeitung der Blutproben für die Glutathionbestimmung

3.2.3.1 Fehlerquellen

Als mögliche Fehlerquellen, die die Meßergebnisse verfälschen können, müssen in Betracht gezogen werden:

1. Hämolyse
2. Oxidation des GSH
3. Absorption des GSH durch Plasmabestandteile.

Zu 1: Erythrocyten besitzen im Vergleich zum Plasma einen 500-fach höheren Gehalt an Glutathion (HAGENFELDT & al., 1978). Durch eine partielle Hämolyse während der Gewinnung und Aufarbeitung der Blutproben würde Glutathion freigesetzt, und infolgedessen würden zu hohe Plasmakonzentrationen gemessen werden. Um eine mögliche Hämolyse zu vermeiden, wurde die Blutgerinnung durch Heparinisierung des Versuchstieres unterbunden. Dabei entspricht die verwendete Heparindosis von 750 E pro 100 g Körpergewicht den Angaben von HÄBERLE & al. (1979), die ähnliche Versuche durchführten.

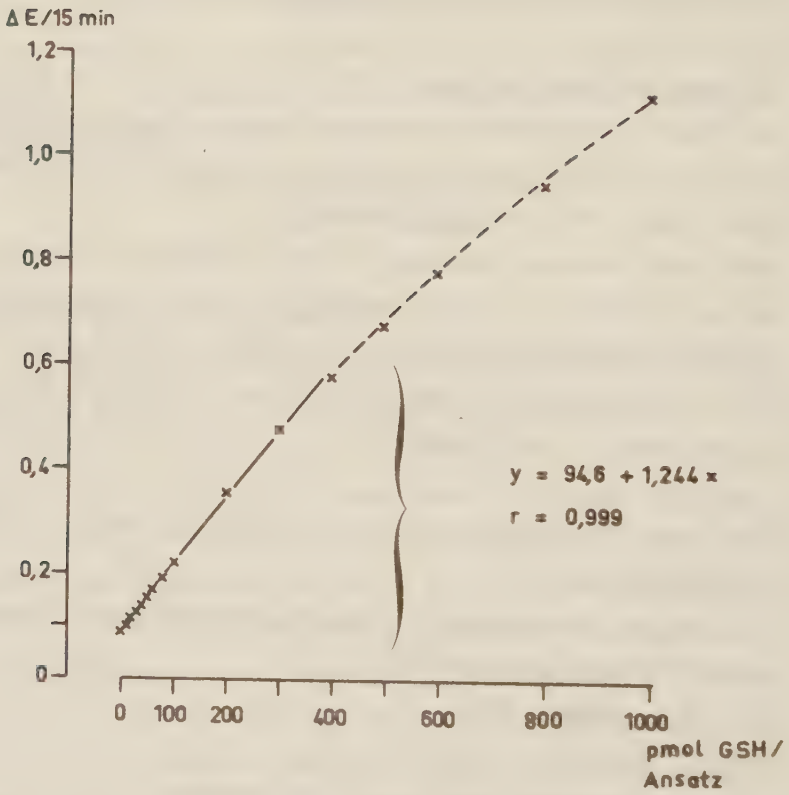

Abb.3.1:
Abhängigkeit der Extinktionszunahme/15 min von der GSH-Konzentration.

Proben mit einem Gehalt von 0 bis 1000 pmol GSH pro Ansatz wurden im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 412 nm wie unter 3.2.4 beschrieben gemessen.
Angegeben sind Mittelwerte aus 3 - 5 Messungen.
In dem Konzentrationsbereich von 10 bis 400 pmol GSH / Ansatz ist die Zunahme der Extinktion linear.

Das ungerinnbar gemachte Blut wird schonend in Plastikgefäßen aufgefangen.

Zu 2 und 3: Die Instabilität des reduzierten Glutathions erfordert eine Reihe von Maßnahmen, durch die eine exakte Bestimmung gewährleistet wird. Bedingt durch die hohe Reaktivität der SH-Gruppe wird GSH insbesondere bei pH-Werten > 7 sehr leicht zu GSSG oxidiert, zum anderen wird es an Plasmaproteine gebunden. BEUTLER & al. (1963) beschreiben den Abbau von GSH im Plasma.

Durch Eiskühlung, schnelles Arbeiten, Ansäuern und Enteiweißen können diese Reaktionen weitgehend verhindert werden. Nach Untersuchungen von GRIMM (1978) eignet sich Metaphosphorsäure zur Ausfällung der Plasmaproteine, da sie die nachfolgende Glutathionbestimmung nicht stört.

3.2.3.2 Aufarbeitung zur Bestimmung der Glutathionkonzentration

Für die ersten, orientierenden Messungen wurde GSH in einer Dosierung von 100 und 200 µmol/kg Körpergewicht injiziert.

Die nach 3.1.2.2 erhaltenen Blutproben mit einem Volumen von 100 µl werden sofort zwei Minuten bei 10000 x g und einer Temperatur von 2 °C zentrifugiert. Unmittelbar nach Beendigung der Zentrifugation werden 20 µl Plasma in 1,5-ml-Reaktionsgefäße pipettiert, in denen sich 140 µl eiskalter, frisch hergestellter 3 %iger Metaphosphorsäurelösung befinden. Die Proben werden gemischt und bis zur anschließenden Zentrifugation zur Abtrennung des ausgefällten Proteins (5 Minuten, 10000 x g, 2 °C) in Eis aufbewahrt. Vom Überstand werden 40 µl zur Bestimmung des Gesamtglutathiongehaltes im Kühlschrank aufbewahrt und kurz vor der Messung mit 0,01 N Salzsäure auf ein Volumen von 1000 µl gebracht. Weitere 40 µl werden zur Maskierung des GSH wie folgt behandelt:

Zuerst erfolgt die Neutralisation der metaphosphorsauren Probe durch Zusatz von 20 µl einer 15 %igen Lösung von tert. Natriumphosphat. Nach kurzem Mischen werden sofort 40 µl einer Lösung von Methylglyoxal (6,25 µmol/ml) und Glyoxalase I (5 U/ml) in Kaliumphosphatpuffer dazupipettiert und erneut gemischt. Die Endkonzentration beträgt für Methylglyoxal 0,25 µmol/100 µl und für Glyoxalase I 0,2 U/100 µl. Diese Ansätze bleiben 30 Minuten im Thermostaten bei 25°C. Nach Ablauf der Reaktionszeit werden die Proben zur Zerstörung des Enzyms durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet. Der trockene Rückstand wird vor der Bestimmung in 500 µl Aqua bidest. gelöst.

3.2.3.3 Aufarbeitung zur Bestimmung der Glutathionkonzentration und des Gesamtthiolgehaltes

Da die zusätzliche Messung des Gesamtthiolgehaltes ein größeres Plasmavolumen erfordert, wird das oben geschilderte Aufarbeitungsschema wie folgt geändert:

Das Blutprobenvolumen beträgt 200 µl. Nach der Zentrifugation werden 80 µl Plasma mit 20 µl 15 %iger Metaphosphorsäurelösung versetzt. Jeweils 10 µl der eiweißfreien Proben werden für die Glutathionbestimmungen eingesetzt. Zur Messung des Gesamtglutathions wird mit 790 µl 0,01 N Salzsäure verdünnt. Die GSSG-Probe wird mit 10 µl 7,5 %iger Natriumphosphatlösung neutralisiert und mit 80 µl einer Lösung von Methylglyoxal (3,125 µmol/ml) und Glyoxalase I (2,5 U/ml) in Kaliumphosphatpuffer versetzt. Wie oben betragen die Endkonzentrationen für Glyoxalase I und Methylglyoxal 0,2 U/100 µl bzw. 0,25 umol /100 µl. Nach der Lyophilisation werden die Rückstände in 800 µl Aqua bidest. aufgenommen.

Zur Bestimmung des Gesamtthiolgehaltes werden 40 µl eiweißfreie Probe verwendet.

3.2.4 Durchführung der Messung

Zur Bestimmung des Glutathions nach der "enzymatic cycling"-Methode in der Modifikation von BREHE & BURCH (1976) wurden zwei Reagenslösungen hergestellt:

Reagens 1		Reagens 2	
DTNB	11,8 mg	NADPH	50,0 mg
BSA	40,0 mg	BSA	20,0 mg
Natriumphosphat-		GR	120 U
Puffer	ad 100 ml	Imidazol-Puffer	ad 100 ml

Diese Lösungen sind bei Aufbewahrung im Kühlschrank eine Woche lang haltbar.

Die Bestimmung wird in Form einer Seriemessung am gleichen Tage durchgeführt:

Jeweils 200 µl der verdünnten Proben werden in Polystyrolgefäße einpipettiert und im Thermostaten bei 25 °C temperiert.

Zu allen Proben werden 200 µl Reagens 1 dazugegeben. Danach werden der Reihe nach 200 µl Reagens 2 im Abstand von genau 30 Sekunden (Stoppuhr) in die Gläschen einpipettiert. Nach dem Mischen werden die Gläschen in den Thermostaten zurückgestellt.

Die Extinktionen der Proben werden nach 15 Minuten in der gleichen Reihenfolge, in der die Reagenszugabe erfolgte, im Abstand von wiederum 30 Sekunden in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 412 nm gegen Aqua bidest. gemessen.

Die Kalibrierung erfolgt mit Hilfe von Eichkurven. Als Standard für

die Bestimmung des Gesamtglutathions wird eine GSH/GSSG-Mischung in einem molekularen Verhältnis von 2:1 in 0,01 N Salzsäure gelöst und eine Verdünnungsreihe hergestellt, die Glutathion, ausgedrückt in GSH-Äquivalenten, in Konzentrationen von 0, 25, 50, 100, 150, 200, 300 und 400 pmol/200 µl enthält. Für die Bestimmung von oxidiertem Glutathion wird GSSG in Aqua bidest. gelöst und eine Verdünnungsreihe mit 0, 12,5, 25, 50, 75, 100, 150 und 200 pmol/200 µl hergestellt.
Die Proben mit bekanntem Gehalt werden zusammen mit den Proben unbekannten Gehalts gemessen.

3.2.5 Bestimmung der Wiederfindung (Recovery) von GSH und GSSG
Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate von reduziertem und oxidiertem Glutathion im Plasma von Ratten wurden folgende Versuche durchgeführt:
Eine Mischung von GSH und GSSG im molaren Verhältnis 2 : 1 wurde in 15 %iger Metaphosphorsäurelösung gelöst. Durch geeignete Verdünnung dieser Stammlösung wurden metaphosphorsaure Glutathionlösungen mit einem Gesamtglutathiongehalt von 16, 4 und 1 nmol/20 µl hergestellt. Daraus resultieren nach den anschließenden Verdünnungsschritten im Zuge der Aufarbeitung Konzentrationen von 400, 100 und 25 pmol Gesamtglutathion pro Bestimmungsansatz. Diese Konzentrationen liegen an der Ober- bzw. Untergrenze sowie in der Mitte des Meßbereiches.
Zu jeweils 20 µl Glutathionlösung der verschiedenen Konzentrationen sowie zu 20 µl reiner MPA-Lösung (zur Bestimmung des basalen Glutathiongehaltes) wurden 80 µl Plasma, welches von einer heparinisierten Ratte erhalten wurde, pipettiert. Die so erhaltenen Proben wurden genau wie unter 3.2.3.2 und 3.2.4 angegeben behandelt und gemessen. An zwei Tagen wurden von jeder Konzentration jeweils fünf Bestimmungen durchgeführt.

Tab.3.2: Recovery von Gesamtglutathion, GSSG und GSH im Plasma von Ratten.

Zugesetzt GSH:	Zugesetzt GSSG:	Tag	Gesamtglutathion (GSH + 2 GSSG) gefunden	./. Basal	Recov. %	GSSG gefunden	./. Basal	Recov. %	GSH (berechnet: Gesamt - 2 GSSG) gefunden	./. Basal	Recov. %
-	-	1	0,658+/-0,078 (5)			0,123+/-0,014 (5)			0,412+/-0,054 (5)		
-	-	2	1,032+/-0,083 (3)			0,179+/-0,018 (3)			0,674+/-0,046 (3)		
0,5	0,25	1	1,671+/-0,082 (5)	1,013	101,3	0,309+/-0,014 (5)	0,186	74,4	1,053+/-0,064 (5)	0,641	128,2
0,5	0,25	2	2,072+/-0,093 (5)	1,040	104,0	0,398+/-0,018 (5)	0,219	87,6	1,275+/-0,057 (5)	0,601	120,2
2	1	1	4,659+/-0,114 (5)	4,001	100,0	0,958+/-0,031 (5)	0,835	83,5	2,742+/-0,055 (5)	2,330	116,5
2	1	2	4,851+/-0,139 (5)	3,819	95,5	1,046+/-0,024 (5)	0,867	86,7	2,759+/-0,123 (5)	2,085	104,2
8	4	1	16,458+/-0,157 (5)	15,800	98,8	3,664+/-0,084 (5)	3,541	88,5	9,130+/-0,132 (5)	8,718	109,0
8	4	2	15,559+/-0,301 (4)	14,527	90,8	3,622+/-0,052 (4)	3,443	86,1	8,316+/-0,309 (4)	7,642	95,5

Mittelwerte +/- SEM (Zahl der Versuche in Klammern). Alle Konzentrationsangaben in nmol / 100 µl.

Zur Auswertung der Versuche wurden die Tagesmittelwerte errechnet. Die mittleren Basalgehalte des Plasmas wurden von den Mittelwerten der Proben subtrahiert, denen Glutathion in einer bestimmten Konzentration zugesetzt worden war. Die so erhaltenen Differenzen (Ist-Werte) wurden mit den Soll-Werten verglichen und die Wiederfindungsrate berechnet (Ist / Soll x 100 %; Tab.3.2).

Die Ergebnisse zeigen eine gute Wiederfindung des Gesamtglutathions, während GSSG besonders in kleinen Konzentrationen nicht vollständig wiedergefunden wird.

Durch eine geringere Verdünnung der Proben mit kleinem GSSG-Gehalt kann diese Ungenauigkeit der Bestimmung verringert werden.

3.2.6 Messung des Gesamtthiolgehaltes

Zur Messung des Gesamtthiolgehaltes wurde die photometrische Methode von ELLMAN (1959) in der Modifikation von CIKRYT (1979) verwendet.

40 µl der enteiweißten Probe werden mit 400 µl Reagenslösung (4,0 mg DTNB und 186,1 mg Titriplex III mit Kaliumphosphat-Puffer ad 100 ml) versetzt. Nach zehn Minuten wird die Extinktionszunahme bei 405 nm gegen Luft gemessen. Zur Kalibrierung wird eine Eichkurve hergestellt, die GSH in Konzentrationen von 0, 2,5, 5, 10, 20, 30 und 40 nmol/40 µl in 3 %iger Metaphosphorsäurelösung enthält.

3.2.7 Auswertung der Glutathion- und Thiolmessungen

Zur Auswertung der Meßergebnisse erfolgt zunächst die Aufstellung der Eichkurven (Berechnung des PEARSON-BRAVAIS'schen Korrelationskoeffizienten r und der Koeffizienten A und B der linearen Regressionsfunktion $y = A + B\,x$) und anschließend die Berechnung der Werte für die unbekannten Proben.

Zur Berechnung der molaren Konzentrationen von GSH und GSSG werden folgende Molekulargewichte zugrunde gelegt:

GSH: Mol.-Gewicht = 307,3

GSSG: Mol.-Gewicht = 612,6.

3.2.8 Berechnung der pharmakokinetischen Parameter

Die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme "Autoan" und "Nonlin" (nach METZLER), deren Arbeitsweise im folgenden kurz skizziert werden soll:

Nach Eingabe der Plasmaspiegeldaten und der Art der Applikation entscheidet der Rechner zuerst, ob die Elimination nach einer MICHAELIS-MENTEN-Kinetik oder nach einer Kinetik erster Ordnung erfolgt. Wird wie im Fall des GSH eine Kinetik erster Ordnung ermittelt, so sucht der Rechner die (poly)exponentielle Gleichung, die den Plasmaspiegelverlauf am besten beschreibt. Auf der Anzahl der exponentiellen Terme dieser Gleichung basiert die Wahl des pharmakokinetischen Modells (Ein-, Zwei- oder Mehrkompartimentmodell).

Einer biexponentiellen Gleichung entspricht beispielsweise das offene Zweikompartimentmodell.

Mit Methoden der nichtlinearen Regression werden anschließend die Meßwerte der dem gewählten Modell entsprechenden Gleichung angepaßt.

3.3 Bestimmung der Plasmaglucosekonzentration

3.3.1 Methode

Die Bestimmung der Plasmaglucosekonzentration erfolgt durch einen automatischen Glucoseanalysator. Das Gerät mißt den bei der Oxidation von Glucose in Gegenwart von Glucose-Oxidase verbrauchten Sauerstoff mit Hilfe eines polarographischen Sauerstoffsensors. Die Sauerstoffabnahme ist der Glucosekonzentration der Probe direkt proportional.

3.3.2 Durchführung der Bestimmung

Die Blutproben werden sofort nach Erhalt vier Minuten bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Sofern parallel zur Messung der Plasmaglucose eine Insulinbestimmung durchgeführt wird, werden dafür jeweils 100 µl Plasma in ein Polystyrolgefäß einpipettiert. Diese Gläschen werden im Gefrierschrank bei -20 ° C bis zum Tage der Insulinbestimmung aufbewahrt. Von dem übrigen Plasma werden 2 x 10 µl (Doppelbestimmung) in den Glucoseanalysator einpipettiert und die Meßergebnisse direkt in mmol/l abgelesen.

3.3.3 Auswertung der Glucosebestimmung

3.3.3.1 Berechnung des K-Wertes

Der K-Wert ist ein Maß für die Geschwindigkeit der Glucoseelimination aus dem Blut. Er kann nach der Gleichung

$$K = (\lg BGo - \lg BGt) / t \times \ln 10 \times 100$$

aus zwei Blutglucosekonzentrationen (BGo = Blutglucose zu Beginn der Messung, BGt = Blutglucose zu einem beliebigen Zeitpunkt t) errechnet werden (SIEGENTHALER, 1973).

Exakter ist die Berechnung der mathematischen Regression aus mehreren Meßwerten. Berechnet man den Regressionskoeffizienten B unter Verwendung der logarithmierten Werte der Plasmaglucosekonzentrationen, so gilt: $B = (\lg BGo - \lg BGt) / t$.

Damit wird der K-Wert aus dem Regressionskoeffizienten B wie folgt berechnet: $K = B \times \ln 10 \times 100$.

In Abhängigkeit von der gewählten Dosis (0,25, 0,5 oder 1,0 g Glucose /kg) verläuft die Elimination unterschiedlich. Abb. 3.2 gibt Auskunft darüber, welche Meßpunkte nach Gabe der verschiedenen Glucosedosen am besten zur Berechnung der linearen Regressionsfunktion und damit auch des K-Wertes geeignet sind:

Bei einer Dosis von 0,25 g/kg sind es die Meßwerte von der 5. bis zur 15. Minute, bei 0,5 g/kg die von der 5. bis zur 20. Minute und bei 1,0 g/kg die von der 5. bis zur 25. Minute. Bei der Verwendung dieser Werte ergeben sich die optimalen Korrelationskoeffizienten.

3.3.3.2 Berechnung der Fläche unter der Plasmaglucosekurve (AUC)

Mit Hilfe eines Computerprogramms werden die Flächen unter den Plasmaglucosekurven aus den Konzentrationsmeßwerten nach der Trapezregel berechnet.

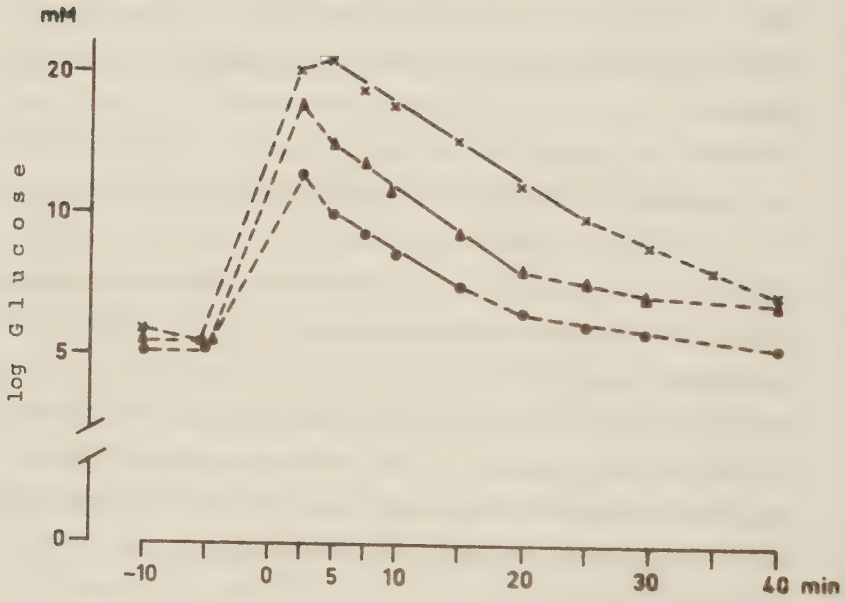

Abb.3.2:
Verlauf der Plasmaglucosespiegel bei der Ratte nach intravenöser Bolusinjektion verschiedener Glucosedosen.

Die Dosierung beträgt: -●- : 0,25 g/kg
-▲- : 0,5 g/kg
-x- : 1,0 g/kg Körpergewicht.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 - 4 Bestimmungen.

Zur Berechnug der K-Werte wurden die Abschnitte der Kurven verwendet, in denen die Glucoseelimination linear verläuft (durchgezogene Linien; $r > 0,996$).

3.4 Insulinbestimmung

Die Insulinkonzentrationen im Plasma werden durch Radioimmunoassay (Doppelantikörpermethode nach SOELDNER & SLONE, 1965) mit dem INSIK-Kit gemessen.

3.4.1 Eichkurven

Zur Standardisierung werden Verdünnungsreihen von Ratteninsulin erstellt und zusammen mit den Proben bestimmt.

3.4.1.1 Herstellung der Eichkurven

Die spezifische Bindung des Insulins an seinen Antikörper wird durch das Medium beeinflußt. Sie ist - wie in einem Vorversuch festgestellt wurde - in Plasma geringer als in Pufferlösung (Abb.3.3). Daher muß zur Lösung und Verdünnung des Standardinsulins Plasma von Ratten verwendet werden. Zu diesem Zweck wird heparinisiertes Blut von narkotisierten Ratten nach Katheterisierung der Arteria carotis gewonnen und zentrifugiert (10 Minuten, 10000 x g, 2°C). Das Plasma wird zur Entfernung des enthaltenen Insulins mit eine Kohlesuspension (25 % G/G in Pufferlösung) versetzt (0,1 ml auf 1 ml Plasma) und unter mehrfachem Umschütteln 30 Minuten im Eis aufbewahrt. Die Kohle wird durch zweifache Zentrifugation entfernt (1. 20 Minuten bei 20000 x g, 2°C; 2. 10 Minuten bei 20000 x g, 2°C). Das Insulin-frei gemachte Plasma wird zur Herstellung der Verdünnungsreihen sowie als Leerwert (Nullpunkt der Eichkurve) verwendet.

3.4.1.2 Einfluß des Glutathions auf den Verlauf der Eichkurven

Zwischen den Disulfidbrücken des Insulinmoleküls und der SH-Gruppe des

Glutathions besteht die Möglichkeit einer Thiol-Disulfid-Austauschreaktion. Da die entstehenden Insulinbruchstücke immunologisch nicht reaktiv sind, ist eine Beeinflussung des RIA denkbar.

Daher wurde in einem Vorversuch geprüft, ob Glutathion in Konzentrationen, in denen es in den Plasmaproben z.T. enthalten ist, den Verlauf der Insulineichkurven verändert. Insulinverdünnungsreihen (0 - 100 µU/ml) ohne sowie mit Zusatz von 75 bzw. 150 nmol/ml Gesamtglutathion in Plasma oder Pufferlösung wurden hergestellt und radioimmunologisch bestimmt. Die Ergebnisse zeigen eine leichte Abflachung des Kurvenverlaufs durch Zusatz von Glutathion, wenn Plasma als Lösungsmittel verwendet wird (Abb.3.3).

Aus diesem Grunde werden zur Kalibrierung Glutathion-haltiger Proben Eichkurven hergestellt, die GSH und GSSG in Konzentrationen enthalten, welche annähernd den (aufgrund der pharmakokinetischen Messungen berechneten) Glutathionkonzentrationen der Proben entsprechen.

3.4.2 Durchführung der Bestimmung

Der lyophilisierte Antikörper wird laut Vorschrift gelöst. Zu den aufgetauten Proben und den Standardlösungen für die Eichkurve werden jeweils 100 µl der Lösung dazugegeben, sorgfälltig gemischt und danach sechs Stunden im Kühlschrank aufbewahrt. Nach Zugabe des gelösten (125)-J-markierten Insulins (100 µl) inkubiert man die Proben weitere 18 Stunden im Kühlschrank.

Anschließend pipettiert man zu allen Proben 1 ml kalten Puffer und zentrifugiert 20 Minuten lang mit 4000 Upm bei 4 °C, so daß der Überstand vom Doppelantikörperkomplex dekantiert werden kann. Eventuell am Gläschen haftende Tröpfchen werden mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

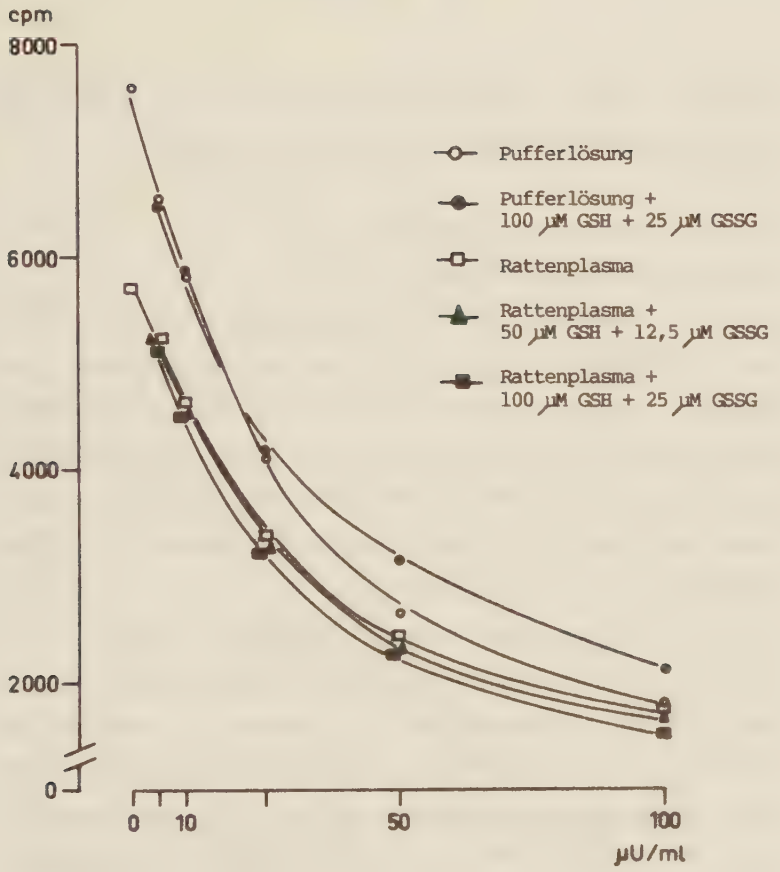

Abb.3.3:
Einfluß des Mediums und des Glutathions im Medium auf die radioimmunologische Bestimmung des Insulins.

Verdünnungsreihen von Ratteninsulin (0 - 100 µU/ml) wurden wie unter 3.4.2 beschrieben radioimmunologisch bestimmt.
Als Lösungsmittel für Ratteninsulin wurde Insulin-freies Rattenplasma oder Pufferlösung verwendet.
Pufferlösung und Plasma wurden außerdem Glutathion (75 und 150 µM) zugesetzt.
Die spezifische Bindung des Insulins betrug in diesem Versuch 50,8 % in Pufferlösung und 38,2 % in Rattenplasma.

Die Proben werden in einem automatischen Gamma-Zähler gemessen. Die Zähldauer beträgt in der Regel eine Minute für jede Probe.

3.4.3 Auswertung der Insulinbestimmung

3.4.3.1 Berechnung der Insulinwerte

Trägt man in einem einfachen Koordinatensystem den Quotienten Bx/Bo (Bx = Countzahl einer Probe mit Insulin, Bo = Countzahl des Leerwertes) auf der y-Achse gegen die Konzentration an Standard-insulin auf der x-Achse auf, so erhält man eine Verdrängungskurve in Form einer Exponentialfunktion (Abb.3.4a). Zur Linearisierung solcher E-Funktionen eignet sich die "logit-log"-Transformation. Der logit berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{logit} = \log \langle Bx/Bo \times 100 \;/\; (100 - Bx/Bo \times 100) \rangle .$$

Die transformierten Quotienten Bx/Bo der Eichwerte werden gegen die logarithmierten Insulinkonzentrationen aufgetragen. Es resultiert eine Eichgerade, deren Korrelations- und Regressionskoeffizienten berechnet werden (Abb.3.4b). Analog werden für die Proben mit unbekanntem Gehalt die logits berechnet und anhand der Eichgerade der Insulingehalt ermittelt.

3.4.3.2 Berechnung der Fläche unter der Plasmainsulinkurve

Aus den vorliegenden Plasmainsulinkonzentrationen werden die Flächen unter den Kurven analog 3.3.3.2 ermittelt.

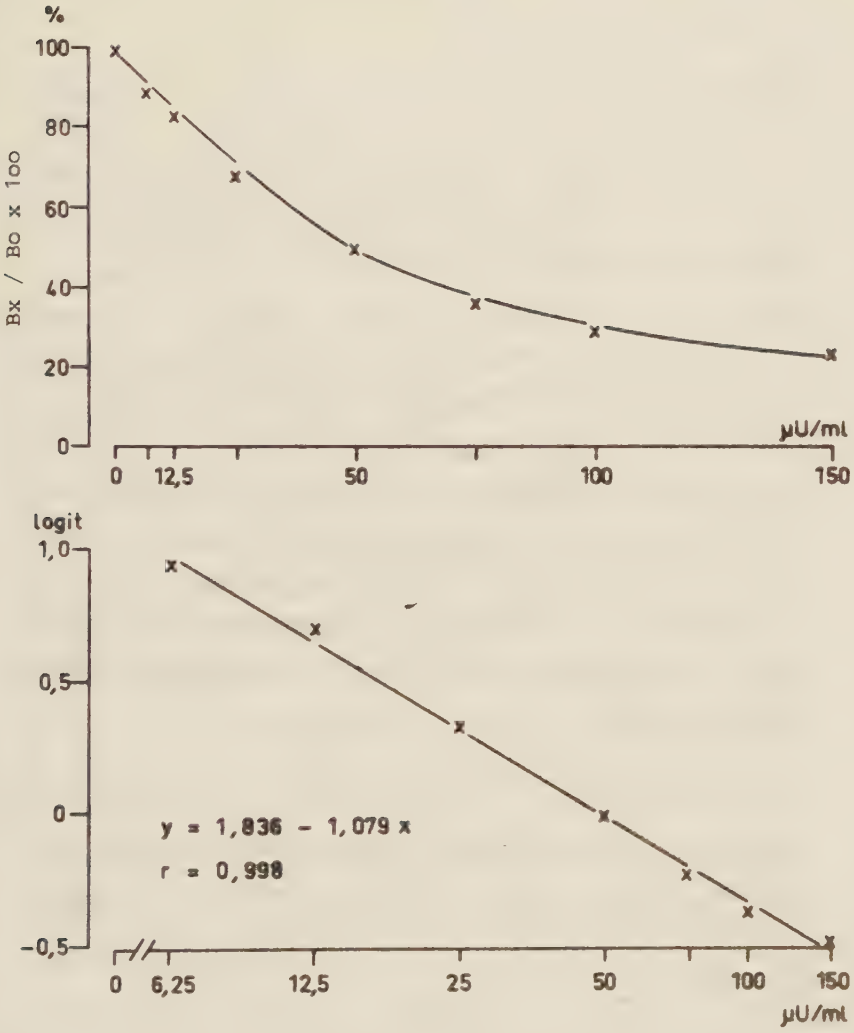

Abb.3.4: Darstellung einer Insulineichkurve.
Oben: Verdrängungskurve, die durch Auftragen der Quotienten Bx/Bo gegen die Konzentration an Standardinsulin erhalten wird.
Unten: Regressionsgerade, die durch Auftragen der transformierten Quotienten (logits) gegen die logarithmierten Standardinsulinkonzentrationen erhalten wird.

Bx = Countzahl einer Insulin-haltigen Probe; Bo = Countzahl des Leerwertes; logit = log < Bx/Bo x 100 / (100 - Bx/Bo x 100) >.

3.5 Statistik

Die in den Abbildungen und Tabellen dargestellten Ergebnisse stellen Mittelwerte +/- SEM dar, errechnet unter Berücksichtigung der in Klammern angegebenen Zahl der Versuche (n).

Der ungepaarte t-Test nach STUDENT wird zur statistischen Prüfung auf Unterschiede zwischen den Mittelwerten zweier Gruppen verwendet.

Zum Vergleich von Mittelwerten aus mehr als zwei Gruppen wird die Varianzanalyse und der F-Test herangezogen. Wenn durch den F-Test ein Unterschied zwischen den Mittelwerten aller Gruppen statistisch gesichert werden kann (Ablehnung der Nullhypothese auf dem 5%-Niveau), erfolgt die Prüfung der Differenz zweier Mittelwerte mit Hilfe des multiplen t-Tests.

Die Regressionsanalyse dient zum Nachweis einer linearen Beziehung zwischen zwei Variablen. Mit einem Computerprogramm werden der Regressionskoeffizient B und der Korrelationskoeffizient r berechnet. Anschließend wird geprüft, ob B und r signifikant von null verschieden sind.

4 ERGEBNISSE

4.1 Pharmakokinetik des Glutathions bei der Ratte

4.1.1 Vorversuche

Reduziertes Glutathion steigert in vitro die Glucose-induzierte Insulinsekretion. Wirksam sind Konzentrationen von 0,1 mM bei der Inkubation isolierter Inseln (HELLMANN & al., 1975a) bzw. von 1 mM beim isoliert-perfundierten Pankreas (AMMON & ABDEL HAMID, 1981).

Die Vorversuche hatten zum Ziel, die GSH-Dosis zu finden, nach deren intravenöser Injektion GSH-Plasmaspiegel im Bereich von 0,1 - 1 mM resultieren. Es wurde angenommen, daß sich GSH als hydrophile Substanz im gesamten extrazellulären Flüssigkeitsraum verteilt. Der Anteil der extrazellulären Flüssigkeit am Gesamtkörpergewicht beträgt bei der Ratte ca. 20 %. Unter diesen Voraussetzungen kann man nach Injektion von 100 bzw. 200 µmol GSH /kg Körpergewicht initiale Plasmaspiegel von 0,5 bzw. 1 mM erwarten.

Die Abbildungen 4.1 und 4.2 zeigen den Verlauf der Plasmaspiegel des Gesamtglutathions (GSH + 2 GSSG), des GSH und des GSSG nach rascher intravenöser Injektion von 100 und 200 µmol GSH /kg.

2,5 Minuten nach Injektion von 100 µmol GSH /kg betragen die Plasmakonzentrationen 298 µM für Gesamtglutathion, 214 µM für GSH und 42 µM für GSSG. Prozentual ausgedrückt liegen 71,7 % des Gesamtglutathions in reduzierter und 14,2 % in oxidierter Form vor. Nach 30 Minuten nähert sich der GSH-Plasmaspiegel mit 8,7 µM dem Basalwert, während vom GSSG noch 2,9 µM gefunden werden (entsprechend 60 % GSH und 20 % GSSG).

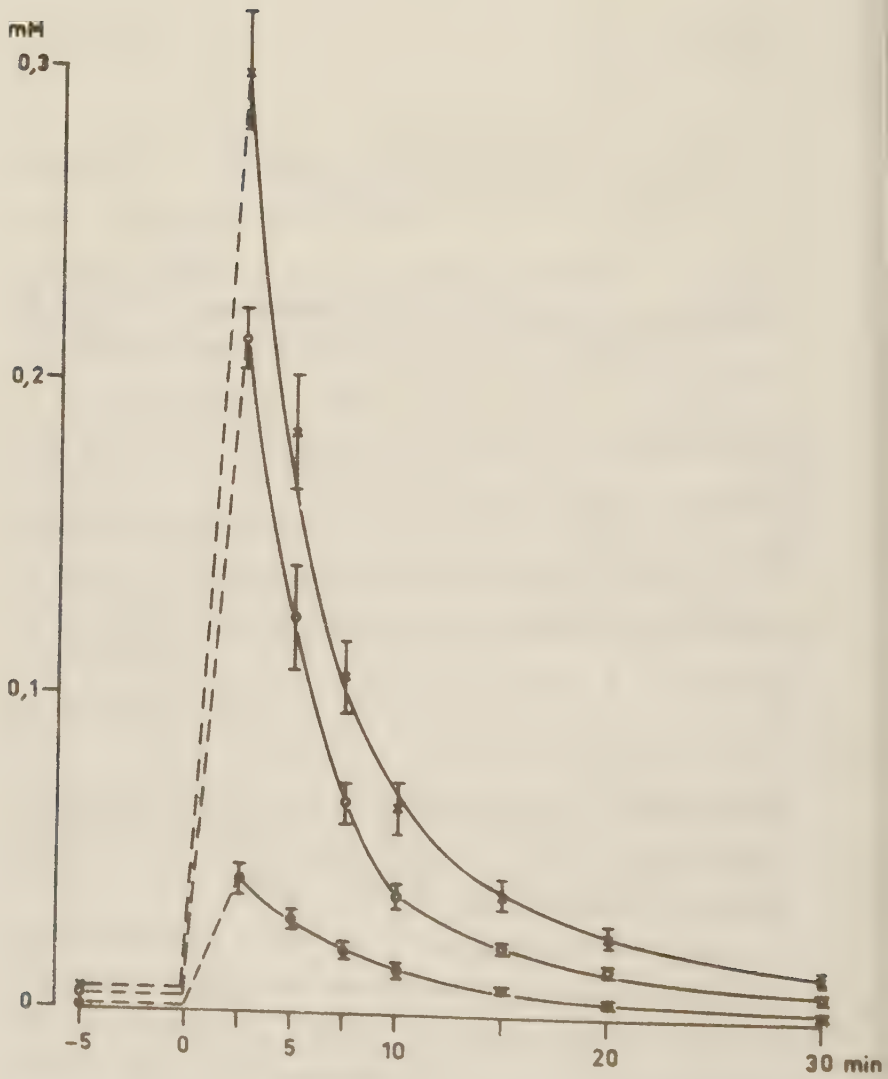

Abb.4.1:
Plasmaspiegel des Glutathions bei der Ratte nach intravenöser Bolusinjektion von 100 µmol GSH /kg Körpergewicht.

Gesamtglutathion (GSH + 2 GSSG): -x- ; GSH: -o- ; GSSG: -●- .
Die GSH-Injektion erfolgte zum Zeitpunkt t = 0'.
Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM, n = 4.

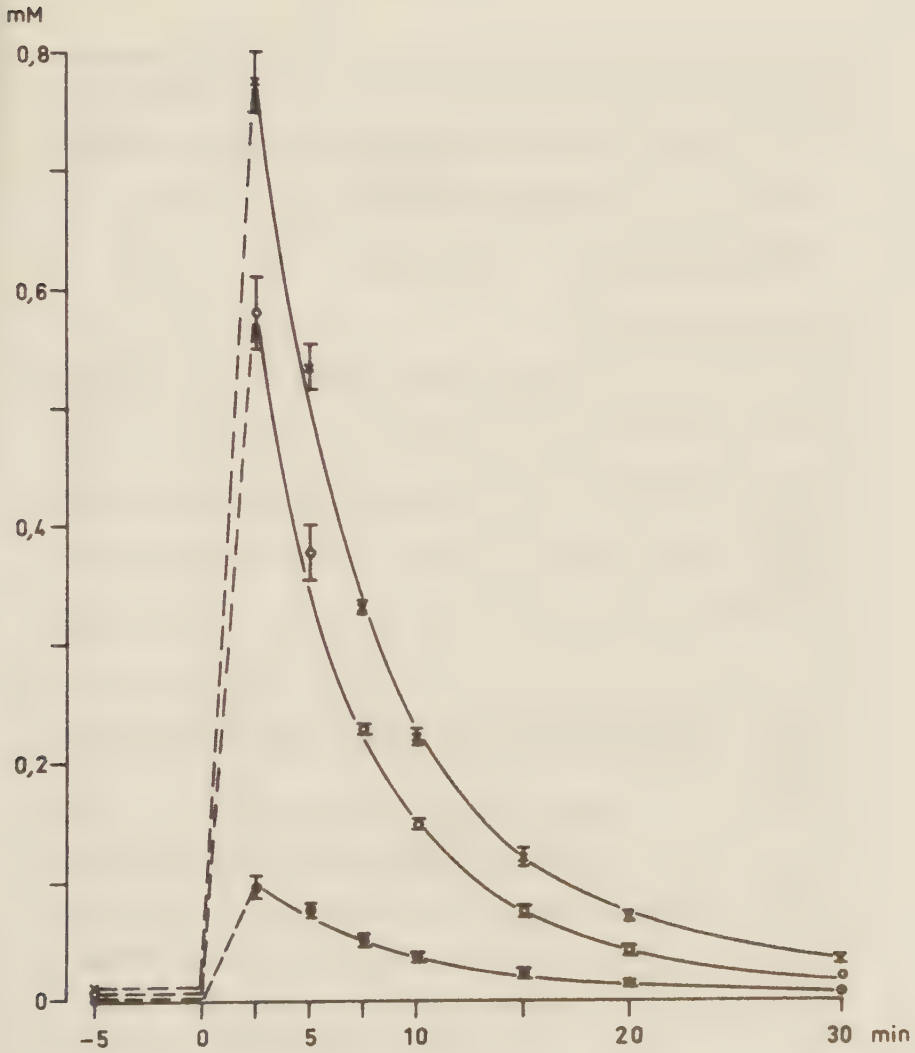

Abb.4.2:
Plasmaspiegel des Glutathions bei der Ratte nach intravenöser Bolusinjektion von 200 µmol GSH /kg Körpergewicht.

Gesamtglutathion (GSH + 2 GSSG): -x- ; GSH: -o- ; GSSG: -●- .
Die GSH-Injektion erfolgte zum Zeitpunkt t = 0'.
Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM, n = 3.

Bei Injektion von 200 µmol GSH /kg findet man nach 2,5 Minuten im Plasma einen Gesamtglutathiongehalt von 777 µM; 75 % davon sind GSH und 12,5 % GSSG. 30 Minuten nach Applikation beträgt die Plasmakonzentration noch 36 µM Gesamtglutathion, wobei 56,7 % auf GSH und 21,7 % auf GSSG entfallen.

4.1.2 Hauptversuche

In Abwandlung der Vorversuche wurde in der folgenden Versuchsserie neben Gesamtglutathion, GSSG und GSH auch die Gesamtkonzentration an freien reduzierten Thiolen (incl. GSH) im Plasma bestimmt. Da diese zusätzliche Bestimmung eine Modifizierung der Aufarbeitung der Blutproben erforderlich machte, sind die Ergebnisse dieser Serie gesondert wiedergegeben.

Nachdem sich die in den Vorversuchen verwendete Dosierung von 100 und 200 µmol GSH /kg als geeignet erwiesen hatte, wurden diese Dosen auch in den Hauptversuchen verwendet. Zusätzlich wurden 50 und 300 µmol/kg appliziert.

Durch Bildung der Differenz zwischen der Gesamtkonzentration an löslichen Plasmathiolen und der zum gleichen Zeitpunkt ermittelten GSH-Konzentration wird deutlich, daß eine Injektion von GSH (in allen verwendeten Dosen) zu einem Anstieg der Konzentrationen anderer DTNB-reaktiver Thiole (z.B. Cystein, Cysteinylglycin) im Plasma führt.

In den Abbildungen 4.3 - 4.6 sind die Plasmaspiegelkurven des GSH, des GSSG und der freien Thiole excl. GSH nach i.v.-Applikation von 50, 100, 200 und 300 µmol GSH /kg dargestellt.

2,5 Minuten nach Injektion von 50 µmol GSH /kg beträgt die Plasmakonzentration im Mittel 150 µM Gesamtglutathion, davon sind 58,5 % GSH

und 20,7 % GSSG. Die Konzentration an reduzierten Thiolen excl. GSH wird durch die GSH-Injektion von 48 auf 118 µM gesteigert. Am Ende des Versuchs (30. Minute) sind noch 18 µM Gesamtglutathion (53,7 % reduziert, 23,2 % oxidiert) nachweisbar. Die Konzentration an freien Thiolen ohne GSH ist zu diesem Zeitpunkt auf 64 µM zurückgegangen.

Die Plasmaspiegel des Gesamtglutathions, GSH und GSSG nach Injektion von 100 bzw. 200 µmol/kg verlaufen ähnlich wie bei den Vorversuchen beschrieben. Der Thiolgehalt des Plasmas (ohne GSH) steigt 2,5 Minuten nach GSH-Applikation auf 153 bzw. 221 µM und sinkt bis zur 30. Minute langsam auf 65 µM ab.

Plasmakonzentrationen von 1044 µM GSH (74,8 %) und 176 µM GSSG (12,6 %) resultieren 2,5 Minuten nach intravenöser Verabreichung von 300 µmol/kg. Die freien Thiole excl. GSH erreichen nach 7,5 Minuten ein Maximum mit 215 µM.

Das Verhältnis der reduzierten zur oxidierten Form des Glutathions wird durch den GSH/GSSG-Quotienten ausgedrückt. Vor der GSH-Injektion wurde der Quotient mit 6,5+/-0,6 (n = 19) ermittelt. Dieser Wert kann durch keine der verwendeten GSH-Dosen gesteigert werden. Im Verlauf der Versuche nimmt der Quotient mit unterschiedlicher Geschwindigkeit ab, erreicht jedoch niemals Werte < 1.

Abbildung 4.7 zeigt den GSH/GSSG-Quotienten nach Gabe der verschiedenen Dosen und in Abhängigkeit von der Zeit.

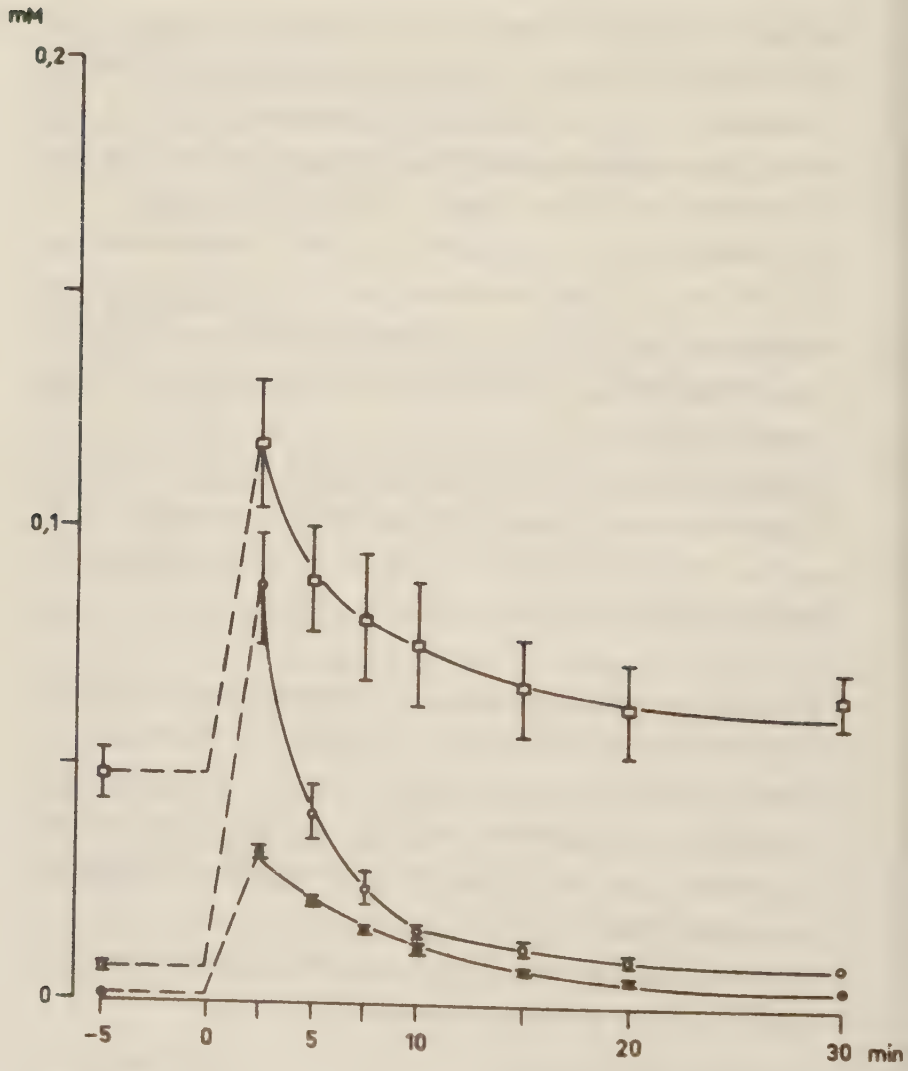

Abb.4.3:
Plasmaspiegel des Glutathions und der DTNB-reaktiven Thiole bei der Ratte nach intravenöser Bolusinjektion von 50 µmol GSH /kg Körpergewicht.
GSH: -o- ; GSSG: -●- ; lösliche Thiole excl. GSH: -□- .
Die GSH-Injektion erfolgte zum Zeitpunkt t = 0'.
Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM, n = 5.

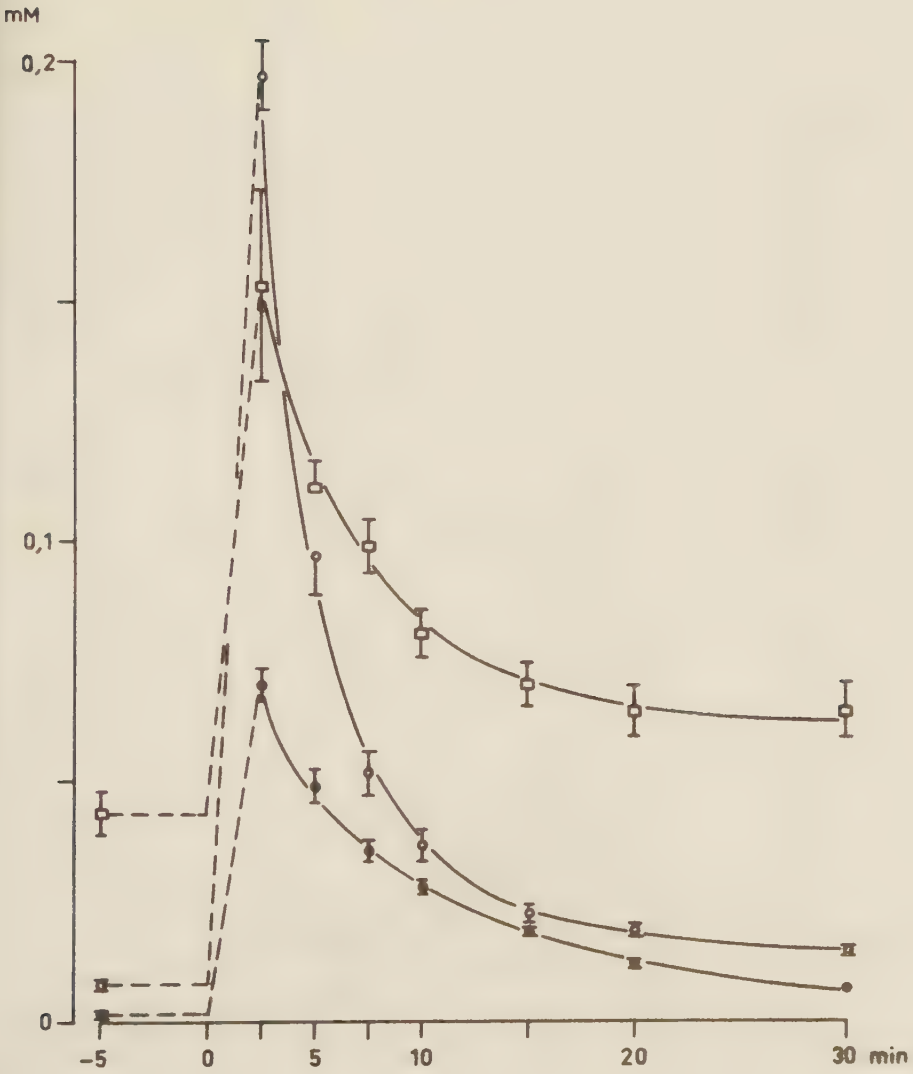

Abb.4.4:
Plasmaspiegel des Glutathions und der DTNB-reaktiven Thiole bei der Ratte nach intravenöser Bolusinjektion von 100 µmol GSH /kg Körpergewicht.
GSH: -o- ; GSSG: -●- ; lösliche Thiole excl. GSH: -□- .
Die GSH-Injektion erfolgte zum Zeitpunkt t = 0'.
Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM, n = 5.

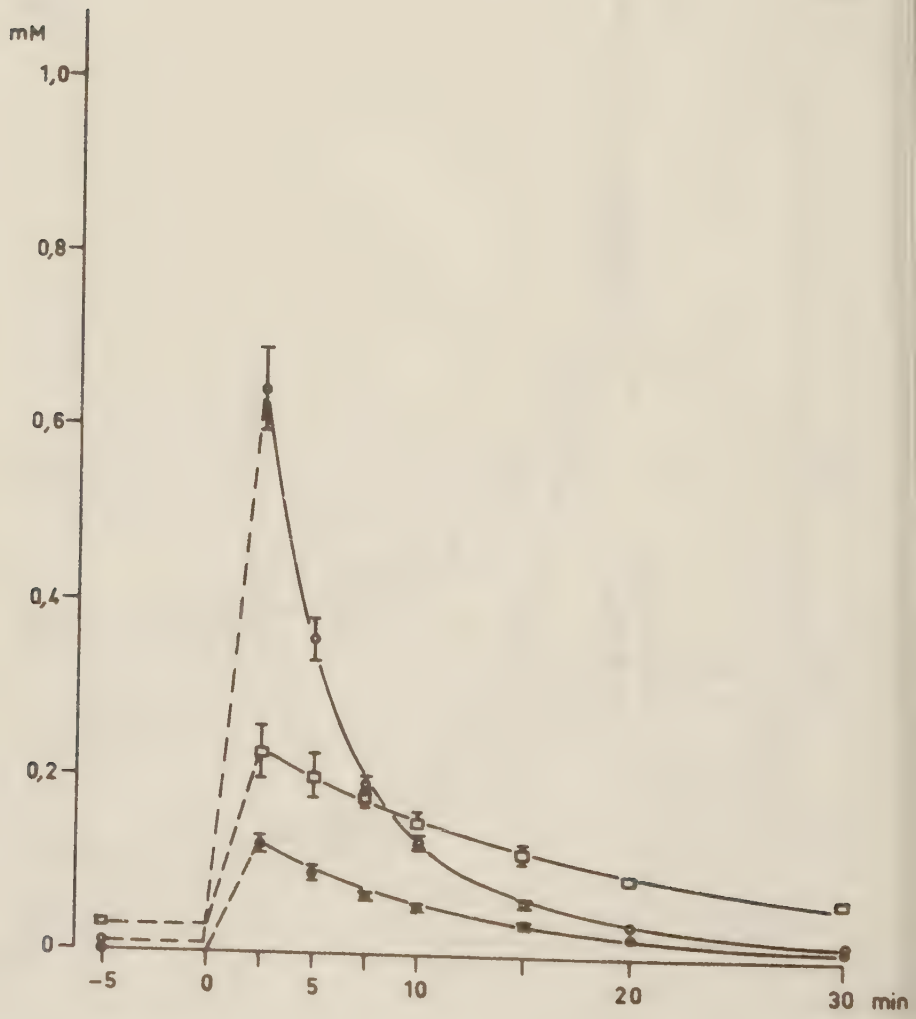

Abb.4.5:
Plasmaspiegel des Glutathions und der DTNB-reaktiven Thiole bei der Ratte nach intravenöser Bolusinjektion von 200 µmol GSH /kg Körpergewicht.
GSH: -o- ; GSSG: -●- ; lösliche Thiole excl. GSH: -□- .
Die GSH-Injektion erfolgte zum Zeitpunkt t = 0'.
Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM, n = 5.

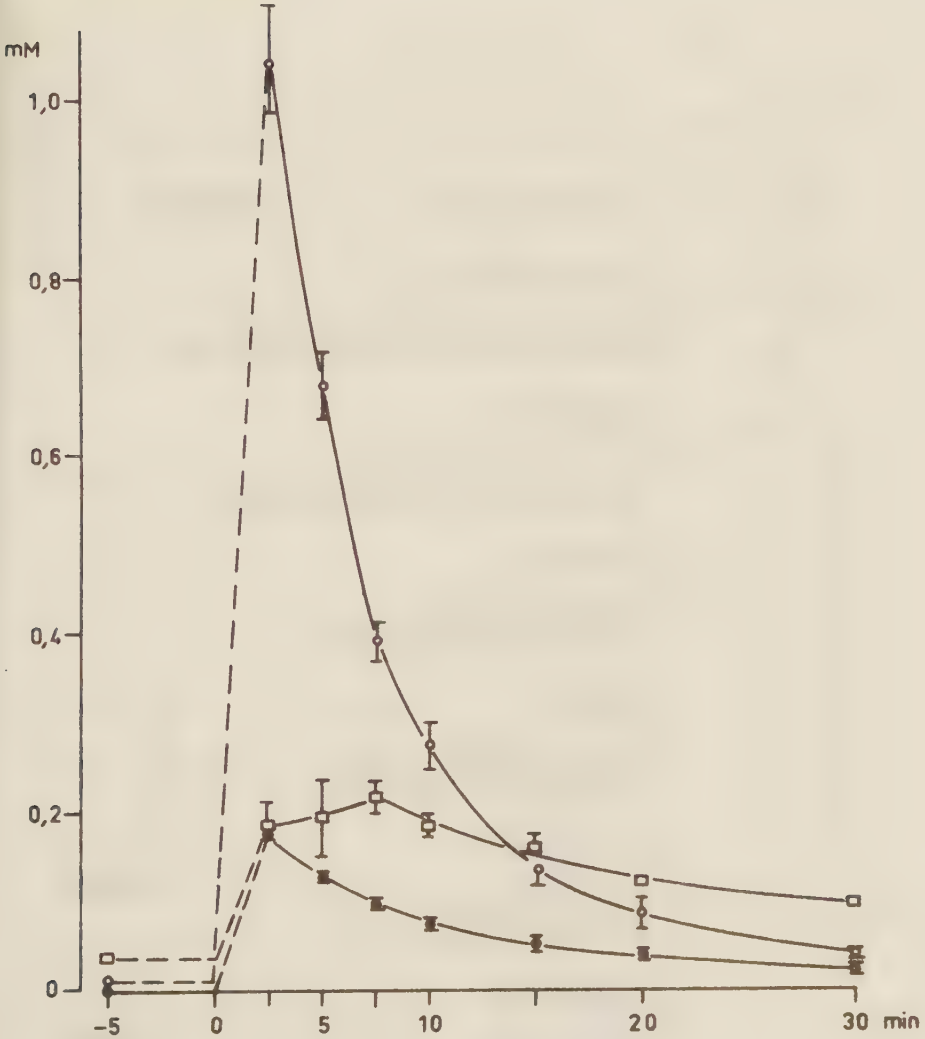

Abb.4.6:
Plasmaspiegel des Glutathions und der DTNB-reaktiven Thiole bei der Ratte nach intravenöser Bolusinjektion von 300 µmol GSH /kg Körpergewicht.
GSH: -o- ; GSSG: -●- ; lösliche Thiole excl. GSH: -□- .
Die GSH-Injektion erfolgte zum Zeitpunkt t = 0'.
Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM, n = 5.

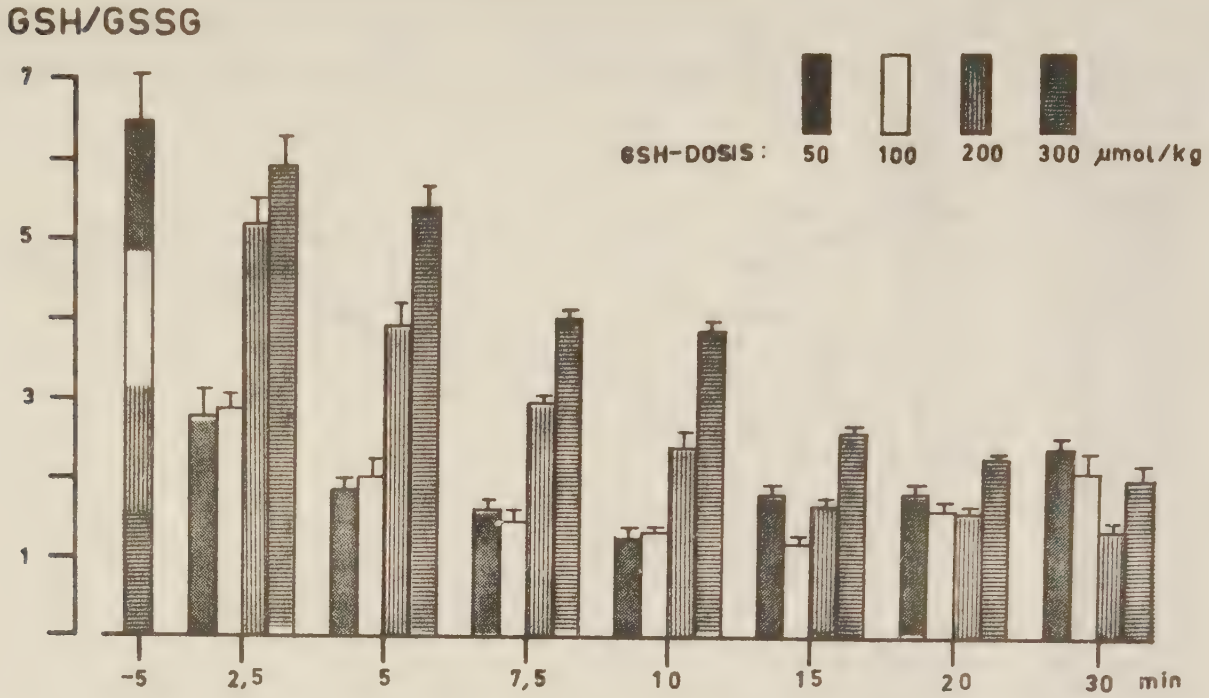

Abb.4.7:
GSH/GSSG-Quotient des Plasmas von Ratten vor und nach intravenöser Injektion von 50, 100, 200 und 300 µmol GSH /kg Körpergewicht.

GSH wurde zum Zeitpunkt t = 0' injiziert. Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM; n = 5 / Dosis (-5': n = 20)

4.1.3 Pharmakokinetische Parameter des reduzierten Glutathions

Die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter des GSH nach rascher intravenöser Injektion aus den vorliegenden Plasmaspiegeldaten (4.1.2) wurde von einem Computer durchgeführt (vgl.3.2.8). Der Rechner liefert Werte für die (fiktive) Plasmakonzentration Cp^{o} sowie für die Geschwindigkeitskonstanten k12, k13 und k21.

Weitere Parameter lassen sich aus diesen Größen unter Zuhilfenahme der in der folgenden Tabelle zusammengestellten Gleichungen berechnen.

Tab.4.1: Gleichungen zur Berechnung pharmakokinetischer Parameter (aus RITSCHEL, 1973).

Geschwindigkeitskonstanten der Eliminations- und Verteilungsphase:

(1) $\beta = \langle k13 + k12 + k21 - \sqrt{(k13 + k12 + k21) - 4\ k13 \times k21} \rangle / 2$

(2) $\alpha = k13 + k12 + k21 - \beta$

Koeffizienten der Plasmaspiegelgleichung:

(3) $B = Cp^{o} \times (\beta - k21) / (\beta - \alpha)$

(4) $A = Cp^{o} - B$

Halbwertszeiten:

(5) $t1/2\ \alpha(\beta) = \ln 2 \times 60 / \alpha(\beta)$

Volumen des zentralen Kompartiments:

(6) $Vp = D / Cp^{o}$

Scheinbares Verteilungsvolumen:

(7) $VD = Vp \times (\alpha - \beta) / (k21 - \beta)$

Verteilungskoeffizient:

(8) $\Delta' = VD / KG$

Totale Plasmaclearance:

(9) $Cl\ (tot) = \beta \times Vp / 60$

4.1.3.1 Pharmakokinetisches Modell

Der Verlauf der Plasmaspiegelkurven des GSH kann bei allen Versuchen am besten durch eine biexponentielle Gleichung ausgedrückt werden. Demzufolge wird Verteilung und Elimination des GSH am besten durch das offene Zweikompartimentmodell (LOO & RIEGELMAN, 1968) beschrieben. In Abbildung 4.8 ist ein solches Modell dargestellt.

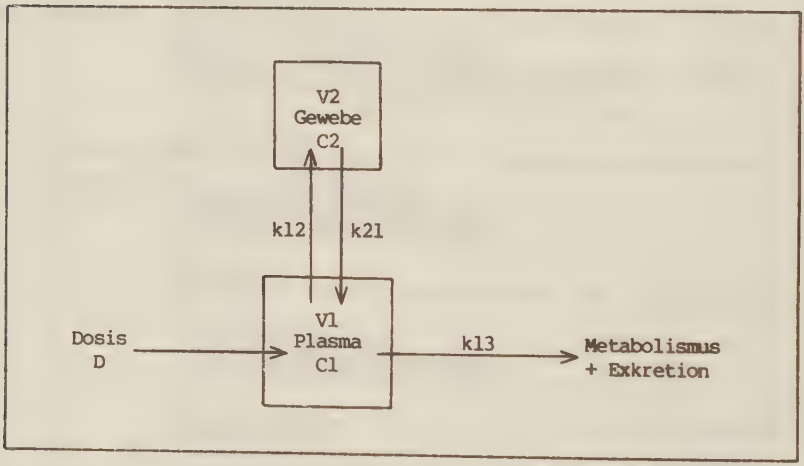

Abb.4.8:
Offenes Zweikompartimentmodell (nach LOO & RIEGELMAN, 1968)

V1 = Volumen des zentralen Kompartiments (= Vp)
V2 = Volumen des peripheren Kompartiments
C1 = Stoffkonzentration im zentralen Kompartiment
C2 = Stoffkonzentration im peripheren Kompartiment
k12 = Geschwindigkeitsrate für den Transfer vom zentralen zum peripheren Kompartiment
k21 = Geschwindigkeitsrate für den Transfer vom peripheren zum zentralen Kompartiment
k13 = Eliminationsgeschwindigkeitskonstante vom zentralen Kompartiment

Mit Hilfe der allgemeinen Gleichung

$$Cp = B \times e^{-\beta t} + A \times e^{-\alpha t}$$

kann die Plasmakonzentration zu jedem beliebigen Zeitpunkt t errechnet werden. Die Werte für die Koeffizienten A und B und die Konstanten α und β variieren in Abhängigkeit von der GSH-Dosis. In Tabelle 4.2 sind die Mittelwerte zusammengestellt.

4.1.3.2 Plasmaspiegel zum Zeitpunkt 0

Der Plasmaspiegel zum Zeitpunkt 0 (Cp^o) ist eine fiktive Größe. Er wird durch Extrapolation der Plasmaspiegelkurve zur y-Achse erhalten. Die Werte für Cp^o liegen zwischen 220 µM nach Injektion von 50 µmol GSH /kg und 1803 µM bei einer Dosis von 300 µmol GSH /kg (Tab.4.2).

4.1.3.3 Halbwertszeiten

Aus den Geschwindigkeitskonstanten α und β werden die Halbwertszeiten für die Verteilungsphase (t1/2 α) und für die Eliminationsphase (t1/2 β) nach Gleichung 5 berechnet.

Die Halbwertszeiten der Verteilungsphase liegen zwischen 1,71 Minuten bei einer GSH-Dosis von 50 µmol/kg und 2,78 Minuten bei einer Dosis von 300 µmol/kg (Tab.4.2). Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen t1/2 α und der applizierten Dosis (Abb.4.9a).

Demgegenüber nimmt die Halbwertszeit der Eliminationsphase mit steigender GSH-Dosis ab. t1/2 β liegt zwischen 52,4 Minuten (50 µmol/kg) und 11,5 Minuten (300 µmol/kg) (Tab.4.2). Abbildung 4.9b zeigt die statistisch signifikante inverse Korrelation zwischen t1/2 β und GSH-Dosis.

Tab.4.2: Plasmakonzentrationen für t = 0, Geschwindigkeitskonstanten und Koeffizienten der Plasmaspiegelgleichung und Halbwertszeiten des GSH nach i.v.-Injektion von 50, 100, 200 und 300 µmol/kg.

GSH-Dosis <µmol/kg>	50	100	200	300
C_p^o <µM>	220,2+/-29,7	456,4+/-28,9	1275+/-123,6	1803+/-111,2
ß <1/h>	0,93+/-0,21	1,48+/-0,43	3,69+/-0,54	3,82+/-0,41
α <1/h>	24,5+/-1,1	21,8+/-1,7	18,3+/-1,1	15,1+/-0,9
B <µM>	15,1+/-3,0	29,9+/-2,9	140,0+/-39,6	296,2+/-75,3
A <µM>	205,2+/-27,1	426,5+/-28,3	1135+/-106,1	1507+/-158,4
t1/2 ß <min>	52,4+/-9,5	36,8+/-7,8	12,2+/-1,6	11,5+/-1,4
t 1/2 α <min>	1,71+/-0,07	1,95+/-0,14	2,30+/-0,13	2,78+/-0,16

Mittelwerte +/- SEM, n = 5 / Dosis.

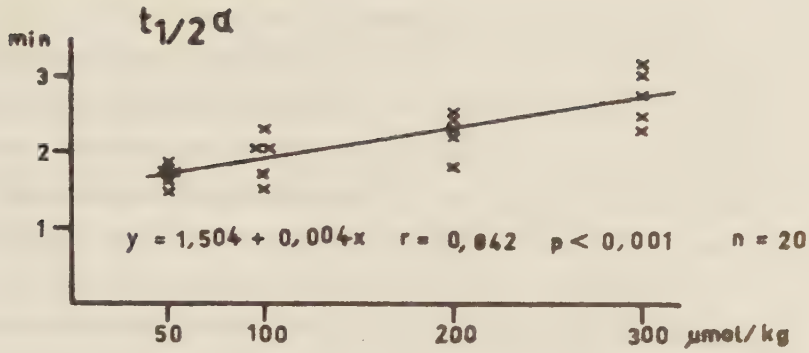

Abb.4.9a:
Korrelation der Halbwertszeit der Verteilungsphase (t1/2 α) des GSH mit der GSH-Dosis (intravenöse Injektion).

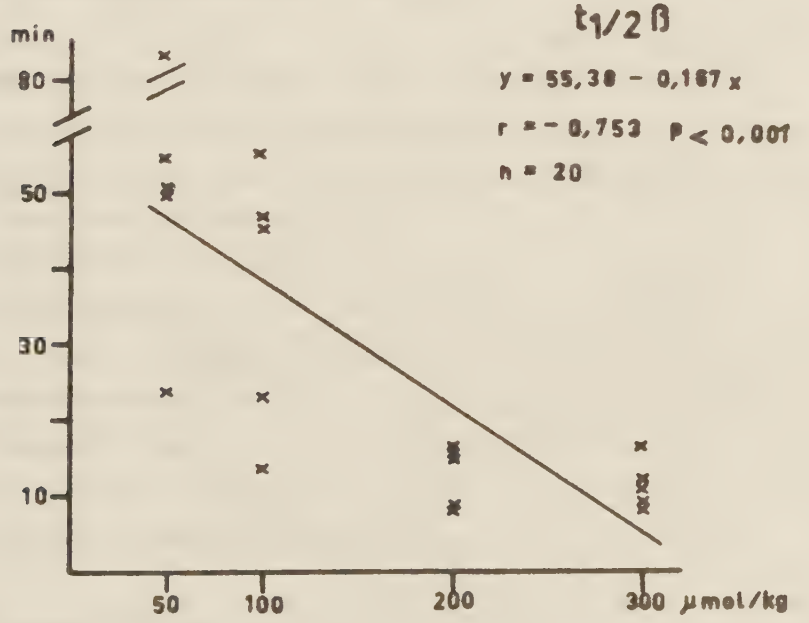

Abb.4.9b:
Korrelation der Halbwertszeit der Eliminationsphase (t1/2 ß) des GSH mit der GSH-Dosis (intravenöse Injektion).

4.1.3.4 Geschwindigkeitskonstanten k13, k12 und k21

Durch eine Konstante κ wird die Geschwindigkeitsrate einer Reaktion erster Ordnung angegeben. Im Falle des Zweikompartimentmodells steht k13 für die Eliminationsrate eines Stoffes aus dem zentralen Kompartiment. Sie ist als Summe der Kontanten der simultan ablaufenden Prozesse von Metabolismus und Exkretion anzusehen. k12 bezeichnet die Geschwindigkeitsrate für die Verteilung des Stoffes vom zentralen zum peripheren und k21 die für die Rückverteilung vom peripheren zum zentralen Kompartiment (vgl. Abb.4.8).

Für k13 wurden vom Computer Werte zwischen 5,53 und 17,66 /h berechnet. Der Mittelwert aller Versuche beträgt 10,80+/-0,63 /h (n = 20). Eine signifikante Korrelation zwischen k13 und GSH-Dosis besteht nicht (r = 0,2257; n.s.).

Die Geschwindigkeitsrate für den Transfer des GSH vom Plasma zum Gewebe ist offensichtlich abhängig von der applizierten GSH-Dosis. Mit steigender Dosis werden die für k12 ermittelten Werte kleiner (14,1 /h bei 50 µmol GSH /kg bis 2,8 /h bei 300 µmol GSH /kg; Abb.4.10a).

Demgegenüber zeigt die Geschwindigkeitsrate für die Rückverteilung ein entgegengesetztes Verhalten: k21 ist mit der GSH-Dosis signifikant korreliert (Abb.4.10b). Im untersuchten Dosisbereich kommt es zu einem Anstieg der Werte für k21 von 2,5 auf 5,8 /h mit zunehmender Dosis.

Um eine Maßzahl für die Penetration des GSH in das Gewebe zu erhalten, wurde der Quotient k12/k21 gebildet. Bei Dosen von 50 bzw. 100 µmol/kg beträgt er 6 bzw. 4, während er bei den beiden höheren Dosen < 1 ist.

Sämtliche Mittelwerte für k13, k12, k21 sowie für k12/k21 sind in Tabelle 4.3 zusammengestellt.

4.1.3.5 Volumen des zentralen Kompartiments

Das Volumen des zentralen Kompartiments Vp wird durch Division der applizierten Dosis durch die initiale Plasmakonzentration Cp^{o} erhalten (Gleichung 6). Als Mittelwert aller Versuche wurde 47,7+/-4,0 ml (n = 20) errechnet. Dieser Wert unterstützt die Hypothese, daß sich GSH im gesamten extrazellulären Flüssigkeitsraum verteilt.

4.1.3.6 Verteilungsvolumen und Verteilungskoeffizient

Das Verteilungsvolumen VD ist definiert als das scheinbare Volumen, welches eine bekannt Stoffmenge im Körper einnimmt. Es ist eine fiktive Größe. Das extrapolierte scheinbare Verteilungsvolumen wird für das Zweikompartimentmodell nach Gleichung 7 berechnet. Da VD vom Körpergewicht abhängig ist, wurde als pharmakokinetischer Parameter der Verteilungskoeffizient Δ' berechnet (Gleichung 8).

Für Δ' wurden Werte zwischen 3,8 und 1,3 ml/g ermittelt. Es besteht eine signifikante inverse Korrelation zwischen Δ' und der GSH-Dosis (Abb.4.11).

4.1.3.5 Plasma-Clearance

Die totale Clearance Cl(tot) gibt das Plasmavolumen an, welches pro Minute von einem Stoff "geklärt" wird. Die Berechnung erfolgt nach Gleichung 9. Abhängig von der GSH-Dosis ergeben sich Werte zwischen 0,8 und 2,4 ml pro Minute, wobei zwischen Cl(tot) und Dosis eine signifikante Korrelation gefunden wurde (Abb.4.12).

Alle Daten für Δ' und Cl(tot) enthält Tabelle 4.4.

Tab.4.3: Geschwindigkeitskonstanten für die Elimination vom zentralen Kompartiment (k13), für den Transfer vom zentralen zum peripheren (k12) und vom peripheren zum zentralen Kompartiment (k21).

GSH-Dosis <µmol/kg>	50	100	200	300
k13 <1/h>	8,78+/-0,96	11,01+/-1,82	13,04+/-0,53	10,35+/-0,79
k12 <1/h>	14,13+/-1,05	9,50+/-0,82	3,67+/-0,39	2,81+/-0,32
k21 <1/h>	2,52+/-0,34	2,80+/-0,54	5,27+/-0,96	5,80+/-0,98
k12/k21	6,00+/-0,80	4,02+/-0,89	0,75+/-0,09	0,51+/-0,05

Mittelwerte +/- SEM, n = 5 / Dosis.

Tab.4.4: Verteilungskoeffizient und totale Plasmaclearance des GSH.

GSH-Dosis <µmol/kg>	50	100	200	300
Δ' <ml/g>	3,78+/-0,62	3,49+/-0,37	1,96+/-0,48	1,33+/-0,33
Cl(tot) <ml/min>	0,84+/-0,13	1,32+/-0,38	2,33+/-0,43	2,44+/-0,31

Mittelwerte +/- SEM, n = 5 / Dosis.

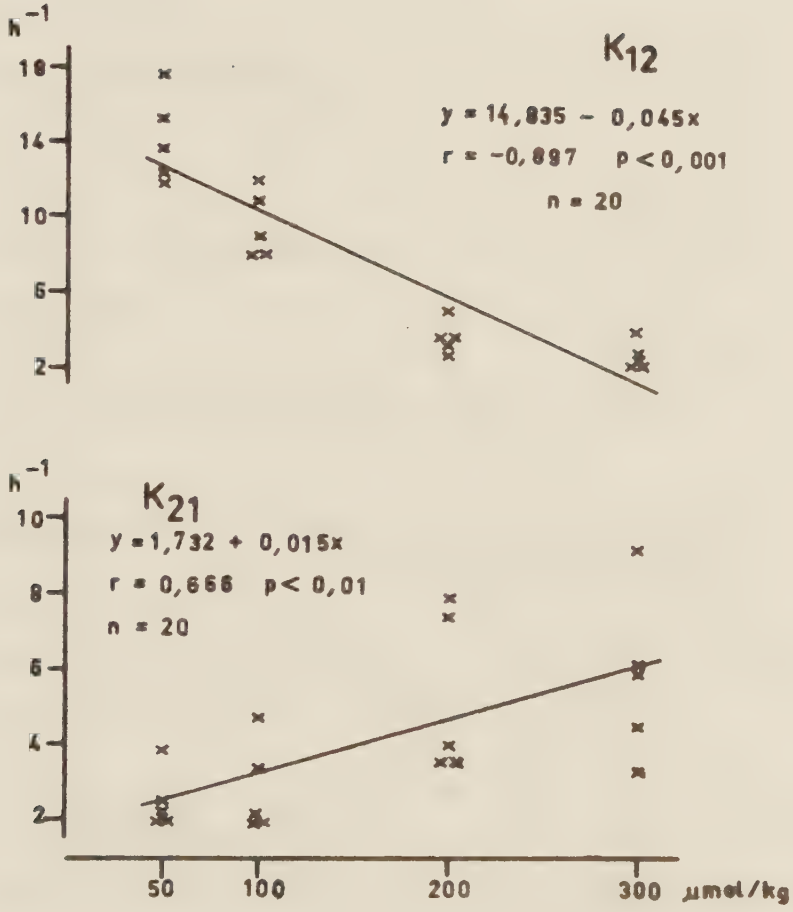

Abb.4.10a (oben):
Korrelation der Distributionskonstante Plasma-Gewebe (k12) des GSH mit der GSH-Dosis (intravenöse Injektion).

Abb.4.10b (unten):
Korrelation der Distributionskonstante Gewebe-Plasma (k21) des GSH mit der GSH-Dosis (intravenöse Injektion).

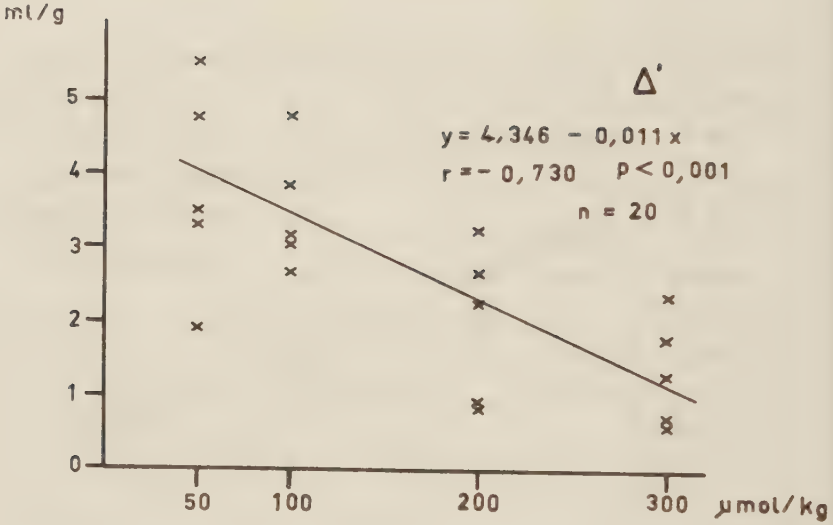

Abb.4.11:
Korrelation des Verteilungskoeffizienten (Δ ') des GSH mit der GSH-Dosis (intravenöse Injektion).

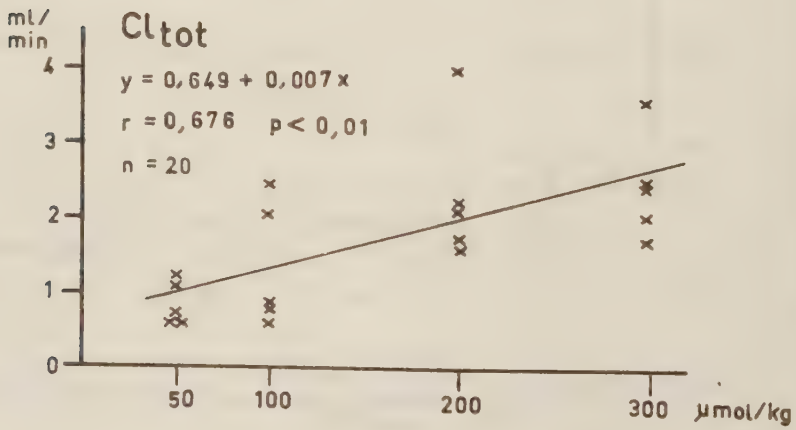

Abb.4.12:
Korrelation der totalen Plasmaclearance (Cl tot) des GSH mit der GSH-Dosis (intravenöse Injektion).

4.1.4 Pharmakokinetik des oxidierten Glutathions

Unter Punkt 4.1.1 und 4.1.2 wurde ein Anstieg der GSSG-Plasmaspiegel nach Injektion von GSH beschrieben. Dabei handelt es sich um GSSG, welches durch Oxidation des GSH endogen entstanden ist und daher als erster Metabolit des GSH aufgefaßt werden kann. Aus den vorliegenden Plasmaspiegeldaten wurden als pharmakokinetische Parameter die Halbwertszeiten und die Geschwindigkeitskonstanten k13, k12 und k21 analog zu denen des GSH berechnet.

Zur Beschreibung der Verteilung und der Elimination des GSSG eignet sich wie beim GSH das offene Zweikompartimentmodell am besten.

4.1.4.1 Halbwertszeiten

Die Halbwertszeiten der Verteilungsphase ($t_{1/2\,\alpha}$) betragen im Durchschnitt 3,21+/-0,13 Minuten (n = 18).

Für die Eliminationsphase werden in Abhängigkeit von der verwendeten GSH-Dosis Halbwertszeiten zwischen 22,26 (50 µmol/kg) und 13,66 (300 µmol/kg) Minuten errechnet ($r = -0{,}5093$; $p < 0{,}05$; $n = 19$).

4.1.4.2 Geschwindigkeitskonstanten k13, k12 und k21

Die Geschwindigkeitskonstanten für die Elimination des GSSG aus dem zentralen Kompartiment zeigen wie die des GSH keine Dosisabhängigkeit. Der Mittelwert aller Versuche beträgt für k13 6,28+/-0,18 /h (n = 19).

Für die Verteilungskonstanten k12 und k21 variieren die gefundenen Werte abhängig von der applizierten GSH-Dosis:

k12 nimmt mit zunehmender Dosis von 5,37 auf 3,12 /h ab ($r = -0{,}5186$; $p < 0{,}05$; $n = 18$), während k21 von 4,62 auf 8,25 ansteigt ($r = 0{,}5189$; $p < 0{,}05$; $n = 19$).

In der folgenden Tabelle sind die Mittelwerte der berechneten Parameter zusammengefaßt.

Tab.4.5: Pharmakokinetische Parameter des oxidierten Glutathions als Metaboliten des intravenös applizierten GSH.

GSH-Dosis <µmol/kg>	50	100	200	300
tl/2 ß <min>	22,26+/-3,22	15,20+/-1,79	14,99+/-1,84	13,66+/-1,25
tl/2 α <min>	3,01+/-0,24	3,32+/-0,41	3,30+/-0,23	3,23+/-0,25
k13 <1/h>	6,24+/-0,50	6,84+/-0,24	5,88+/-0,26	6,26+/-0,35
k12 <1/h>	5,37+/-0,72	3,57+/-0,64	3,42+/-0,24	3,22+/-0,47
k21 <1/h>	4,62+/-0,69	5,53+/-0,98	6,52+/-1,05	8,25+/-1,61
	(5)	(4)	(5)	(5)

Mittelwerte +/- SEM, Zahl der Versuche in Klammern.

4.1.5 Glutathionplasmaspiegel bei GSH-Dauerinfusion

Mit Hilfe der nachfolgend geschilderten Versuche sollte diejenige GSH-Dosis ermittelt werden, durch deren kontinuierliche intravenöse Infusion bei der Ratte Plasmaspiegel von 0,1 mM GSH über einen längeren Zeitraum hinweg aufrecht erhalten werden können.

Reduziertes Glutathion wurde als 5- bzw. 10-mmolare Lösung mit einer Geschwindigkeit von 75 µl pro Minute infundiert. Der Verlauf der Plasmakonzentrationen des Gesamtglutathions, des GSSG und GSH sowie der freien Thiole wurde bestimmt.

Die resultierenden Plasmaspiegel sind in Abbildung 4.13 wiedergegeben.

Bei Infusion von 0,375 µmol GSH pro Minute steigt der GSH-Plasmaspiegel von 7 µM kontinuierlich bis auf 70 µM nach einer Stunde. Der Gehalt an oxidiertem Glutathion wird durch die GSH-Infusion von 1,8 bis auf 23 µM erhöht, und die Konzentration an freien Thiolen excl. GSH steigt von 50 auf 78 µM.

Wird eine GSH-Lösung doppelter Konzentration infundiert (0,75 µmol/Minute), so resultiert nach 20 Minuten ein GSH-Plasmaspiegel von 93 µM, der in den folgenden 20 Minuten nur langsam bis auf 127 µM weiter ansteigt und 60 Minuten nach Infusionsbeginn 173 µM erreicht. Die Plasmakonzentrationen von GSSG und den freien Thiolen excl. GSH werden durch die Infusion kontinuierlich auf 45 µM (GSSG) bzw. 91 µM (Thiole) erhöht.

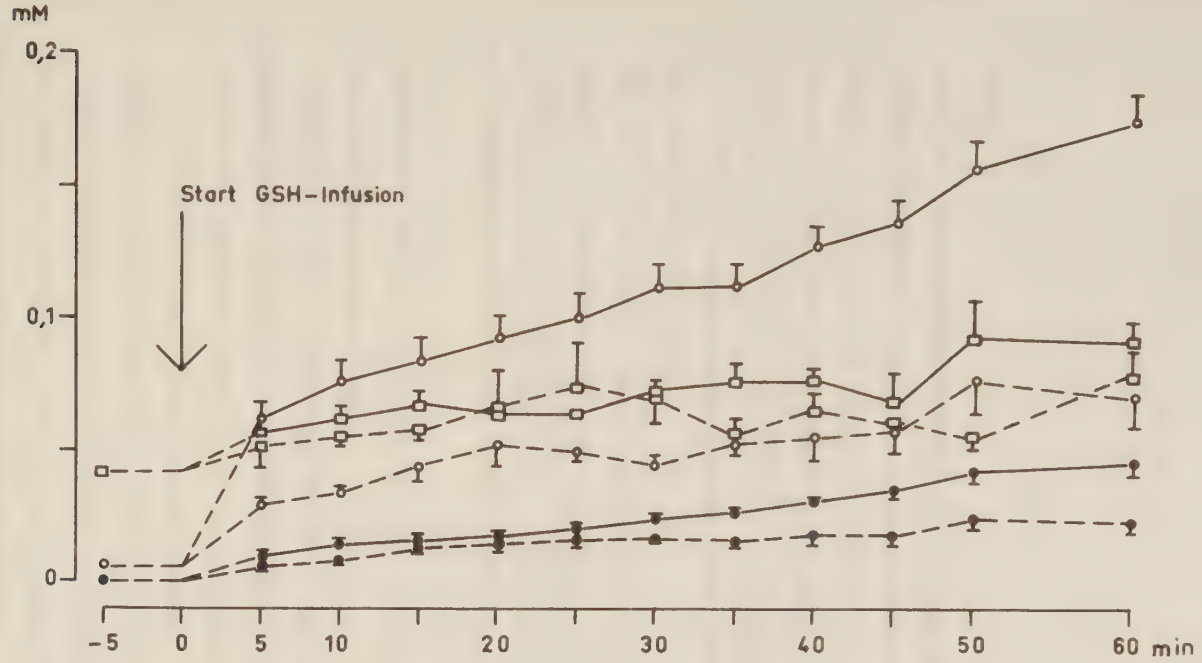

Abb.4.13:
Plasmaspiegel des Glutathions und der DTNB-reaktiven Thiole der Ratte bei kontinuierlicher intravenöser Infusion einer 5- bzw. 10 mmolaren GSH-Lösung.

Infusionsrate: 0,375 µmol/min (- - -), n = 3; 0,75 µmol/min (-----), n = 5.
GSH: -o- ; GSSG: -●- ; lösliche Thiole excl. GSH: -□- . Angegeben sind Mittelwerte +/- SEM

4.2 Einfluß von reduziertem Glutathion auf die Glucosetoleranz und die Insulinsekretion der Ratte in vivo

4.2.1 Intravenöse Glucosetoleranztests nach GSH-Bolusinjektion

Nachdem aus in-vitro-Experimenten bekannt ist, daß reduziertes Glutathion in Anwesenheit stimulatorischer Glucosekonzentrationen die Insulinsekretion steigert, sollte im zweiten Teil der Arbeit untersucht werden, ob dieser Effekt auch in vivo gezeigt werden kann.

Inkubationsversuche mit isolierten Langerhans'schen Inseln haben ergeben, daß GSH die beste Wirkung zeigt, wenn es kurzzeitig (10 Minuten) mit der durch Glucose stimulierten Insel zusammengebracht wird (AMMON & al., 1984a).

Daraus wurde für die in vivo-Versuche gefolgert:

1. Da GSH nur zusammen mit einer die Freisetzung von Insulin stimulierenden Konzentration an Glucose einen Effekt auf die Insulinsekretion hat, muß auch in vivo ein Glucosestimulus erfolgen. Dies geschieht durch intravenöse Injektion eines Glucosebolus.
2. GSH muß kurz vor der Glucoseinjektion appliziert werden, damit seine Gewebekonzentration bei Eintreffen des Glucosestimulus möglichst hoch ist, denn aufgrund der pharmakokinetischen Daten kann nicht davon ausgegangen werden, daß durch einmalige Injektion ein konstanter GSH-Spiegel für längere Zeit aufrecht erhalten werden kann.

4.2.1.1 Vorversuche: IVGTT ohne Bestimmung des Plasmainsulins

In den Vorversuchen wurden die nach intravenöser Glucosebelastung auftretenden Plasmaglucosespiegel gemessen. Die Fragestellung lautete, ob und ggf. unter welchen Bedingungen ein Einfluß des GSH auf die Glucoseelimination sichtbar wird. Der IVGTT in dieser einfachen Form bietet

sich hier als Suchtest an, da er schnell und relativ kostengünstig durchzuführen ist.

Die Glucosedosis wurde mit 0,25 g/kg bewußt niedrig gewählt, um die Insulinsekretion nicht maximal, d.h. durch GSH nicht mehr steigerbar, zu stimulieren.

4.2.1.1.1 Einfluß des Geschlechts der Versuchstiere auf den IVGTT

Glucosetoleranztests wurden mit 6 männlichen und 6 weiblichen Ratten durchgeführt. Jeweils 3 Tiere eines Geschlechts erhielten 5 Minuten vor der Glucoseinjektion 100 µmol GSH /kg i.v.

Der Verlauf der Plasmaglucosespiegel von weiblichen und männlichen Ratten weist sowohl bei den mit GSH behandelten als auch bei den unbehandelten Tieren Unterschiede auf: Bei den weiblichen Tieren scheint die Glucoseelimination in beiden Fällen rascher zu erfolgen als bei den männlichen.

Besonders deutlich werden die Unterschiede, wenn man die K-Werte und die Flächen unter den Plasmaglucosekurven, die in Tabelle 4.6 wiedergegeben sind, nach Geschlechtern getrennt betrachtet. Die K-Werte der männlichen Tiere betragen im Mittel 3,73 bzw. 4,28 (ohne / mit GSH), während für weibliche Ratten K-Werte von 4,28 bzw. 4,95 errechnet wurden.

Obgleich Unterschiede zwischen den K-Werten aufgrund der geringen Zahl der Versuche statistisch nicht gesichert sind, wurden zur Vermeidung einer geschlechtsbedingten Variabilität in den Versuchsergebnissen für alle folgenden Glucosetoleranztests ausschließlich weibliche Ratten verwendet.

4.2.1.1.2 Einfluß verschiedener GSH-Dosen auf den IVGTT

In dieser Versuchsserie wurde geprüft, ob durch Variation der Dosis oder des Zeitpunkts der GSH-Applikation ein Effekt sichtbar wird. GSH wurde in Dosen von 100, 200 und 300 µmol/kg jeweils 10 Minuten vor der Glucoseinjektion und in der Dosierung von 100 µmol/kg außerdem 5 Minuten vor der Glucose appliziert.

Die Glucoseplasmaspiegel verlaufen bei allen 5 Gruppen weitgehend parallel, sodaß eine Beeinflussung der Glucoseelimination durch eine der verwendeten GSH-Dosen unwahrscheinlich erscheint.

Den der Berechnung der K-Werte zugrunde liegenden Verlauf der Glucoseelimination aus dem Plasma während der ersten 15 Minuten nach Injektion des Glucosebolus zeigt Abbildung 4.14. Abgesehen von einer leichten Steigerung des K-Wertes von 3,56 (Kontrollgruppe) auf 4,13 durch GSH in einer Dosis von 100 µmol/kg (10 Minuten vor Glucoseinjektion) hatten die übrigen Dosen keinen Einfluß auf die Glucoseelimination. Die statistische Prüfung der K-Werte ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten der 5 Gruppen.

Ebensowenig unterschieden sich die Flächen unter den Plasmaglucosekurven (Tab.4.7).

4.2.1.1.3 Variation der Glucosedosis

In einer dritten Versuchsserie wurde untersucht, ob GSH in Gegenwart höherer Glucosekonzentrationen einen Effekt auf die Glucoseelimination hat. Dazu wurde Glucose in einer Dosierung von 1,0 g/kg injiziert. Vom GSH wurden wiederum 100 µmol/kg 5 Minuten vorher gegeben.

Auch mit dieser Versuchsanordnung waren Unterschiede weder bei den K-Werten noch bei den Flächen unter den Plasmaglucosekurven festzustellen (Tab.4.8).

Tab.4.6: K-Werte und Flächen unter den Plasmaglucosekurven (5.- 30. Minute) bei männlichen und weiblichen Ratten mit und ohne Vorbehandlung mit 100 µmol GSH /kg i.v.

GSH-Dosis <µmol/kg>	0		100 (5' vor Glucose)	
Geschlecht	männlich	weiblich	männlich	weiblich
K-Wert	3,73+/-0,41	4,28+/-0,19	4,28+/-0,56	4,95+/-0,93
AUC <mM/l x min>	100,1+/-14,5 (3)	83,8+/- 4,9 (3)	89,4+/-18,0 (3)	80,7+/-17,5 (3)

Mittelwerte +/- SEM, Zahl der Versuche in Klammern.

Tab.4.8: K-Werte und Flächen unter der Plasmaglucosekurve (5.- 30. Minute) nach i.v.-Injektion von 0 oder 100 umol/kg GSH und Glucosebolus (1 g/kg).

GSH-Dosis <µmol/kg>	0	100 (5' vor Glucose)
K-Wert	3,87+/-0,14	3,77+/-0,16
AUC <mM/l x min>	398,8+/-25,8 (4)	435,9+/-16,2 (5)

Mittelwerte +/- SEM, Zahl der Versuche in Klammern.

Tab.4.7: K-Werte und Flächen unter den Plasmaglucosekurven (5.- 30. Minute) nach i.v.-Injektion von 0, 100, 200 und 300 µmol GSH /kg und Glucosebolus (0,25 g/kg).

GSH-Dosis <µmol/kg>	0	100	100	200	300
Zeitpunkt d. GSH-Appl.	-	-5'	-10'	-10'	-10'
K-Wert	3,56	3,58	4,13	3,50	3,62
SEM	0,29	0,24	0,23	0,50	0,13
AUC <mM/l x min>	92,1	98,6	90,1	112,9	85,7
SEM	18,2	6,6	5,5	7,4	5,9
	(4)	(4)	(5)	(4)	(4)

Mittelwerte +/- SEM, Versuchszahl in Klammern.

Statistik: K-Werte: $F = 0,82 < 3,01 (= F0,05)$: n.s.

AUC: $F = 1,18 < 3,01 (= F0,05)$: n.s.

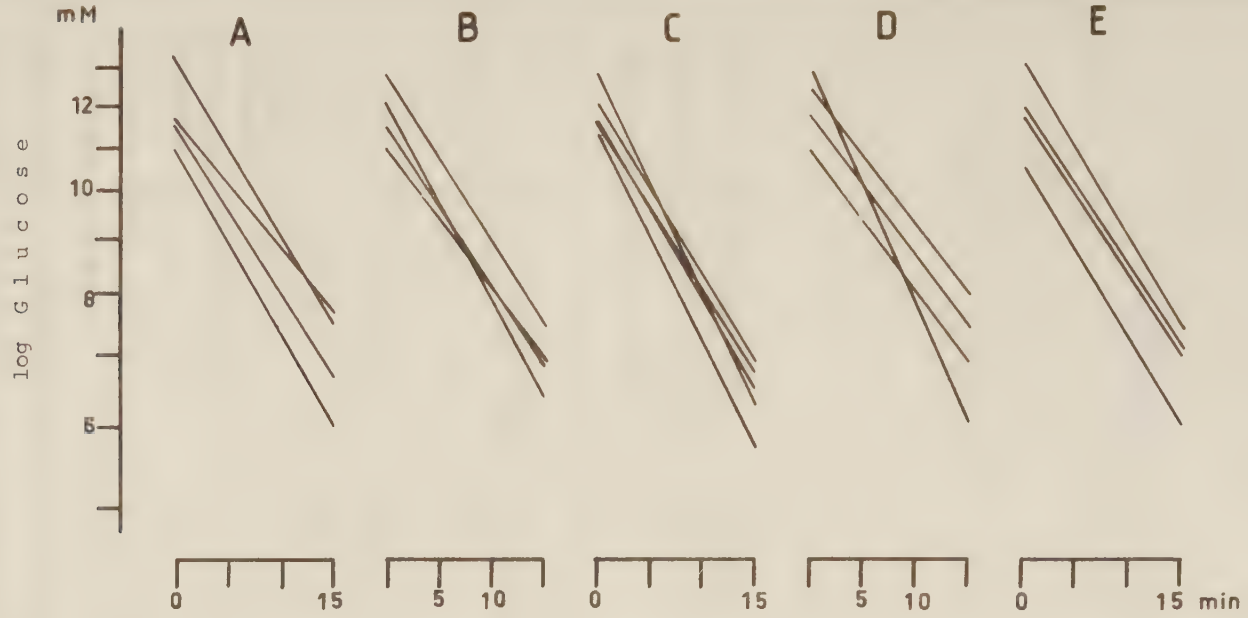

Abb.4.14:
Einfluß von intravenös injiziertem GSH auf die Elimination der Glucose aus dem Plasma von Ratten während des IVGTT.

Glucose (0,25 g/kg) wurde als Bolus zum Zeitpunkt t = 0' i.v. gegeben.
Die GSH-Dosierung betrug 0 (A), 100 µmol/kg 5 (B) und 10 Minuten (C) vor der Glucoseinjektion und 200 (D) und 300 µmol/kg (E) jeweils 10 Minuten vor Glucosegabe.
Die entsprechenden K-Werte betragen im Mittel: 3,56 (A), 3,58 (B), 4,13 (C), 3,50 (D) und 3,62 (E).

4.2.1.2 IVGTT mit Bestimmung des Plasmainsulins

In den bisherigen Versuchen konnte eine Beeinflussung der Glucoseelimination durch GSH nicht festgestellt werden. Es ist jedoch denkbar, daß GSH in erster Linie die zweite Phase der Insulinsekretion stimuliert. Da diese Phase erst ungefähr zwanzig Minuten nach Glucosestimulation beginnt, wäre in diesem Falle die Ermittlung des K-Wertes, dessen Berechnung auf der Glucoseelimination während der ersten zwanzig Minuten beruht, allein nicht aussagekräftig. Um herauszufinden, ob also die Bestimmung des K-Wertes als Prüfmodell ungeeignet ist oder ob vom GSH keine Wirkung auf die Glucose-stimulierte Insulinsekretion ausgeht, wurden die nach intravenöser Glucosebelastung auftretenden Insulinplasmaspiegel bestimmt.

Unter dem Aspekt der Pharmakokinetik erschien es günstig, kleine GSH-Dosen kurz vor der Glucoseinjektion zu applizieren, da die Verteilung zwischen Plasma und Gewebe bei kleinen Dosen besser zu sein scheint (größeres scheinbares Verteilungsvolumen). Glucose wurde in der mittleren Dosierung von 0,5 g/kg gegeben.

4.2.1.2.1 Erste Versuchsserie

Jeweils 4 weibliche Ratten erhielten 100 µmol 2 bzw. 5 Minuten oder 50 µmol GSH /kg 2 Minuten vor Glucoseinjektion.

Die Plasmainsulin- und die Plasmaglucosekonzentrationen dieser drei Gruppen und die der Kontrollgruppe sind in Abbildung 4.15 wiedergegeben. Man erkennt eine gegenüber der Kontrolle m.o.w. deutlich gesteigerte Insulinsekretion bei allen mit GSH behandelten Gruppen. Allerdings ist anzumerken, daß auch die basalen Insulinspiegel bei diesen Gruppen z.T. merklich höher liegen als bei der Kontrolle. Statistisch signifikant unterscheiden sich die Plasmainsulinkonzen-

trationen jedoch zu keinem der zehn Meßzeitpunkte.

Als Maß für die Nettosekretionsleistung wurde die Fläche unter der Insulinkurve für jeden Einzelversuch berechnet. Die statistische Prüfung ergab wegen der großen Varianz innerhalb der Gruppen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten. Auch zwischen den K-Werten der einzelnen Gruppen konnten Unterschiede statistisch nicht gesichert werden (Tab.4.9).

Tab.4.9: Flächen unter den Insulinkurven (5.- 40. Minute) und K-Werte nach i.v.-Applikation von 0, 50 und 100 µmol/kg GSH und intravenöser Glucosebelastung (0,5 g/kg).

GSH-Dosis <µmol/kg>	0	50	100	100
Zeitpunkt d. GSH-Appl.	-	-2'	-2'	-5'
AUC Insulin <µU/ml x min>	1907,5	2879,0	2300,8	1850,8
SEM	595,1	596,5	512,3	479,3
K-Wert	4,10+/-0,14	4,13+/-0,39	4,13+/-0,37	4,73+/-0,39

Mittelwerte +/-SEM, n = 4 pro Gruppe.

Statistik: AUC: F = 0,64 < 3,49 (= F0,05): n.s.

K-Wert: F = 0,83 < 3,49: n.s.

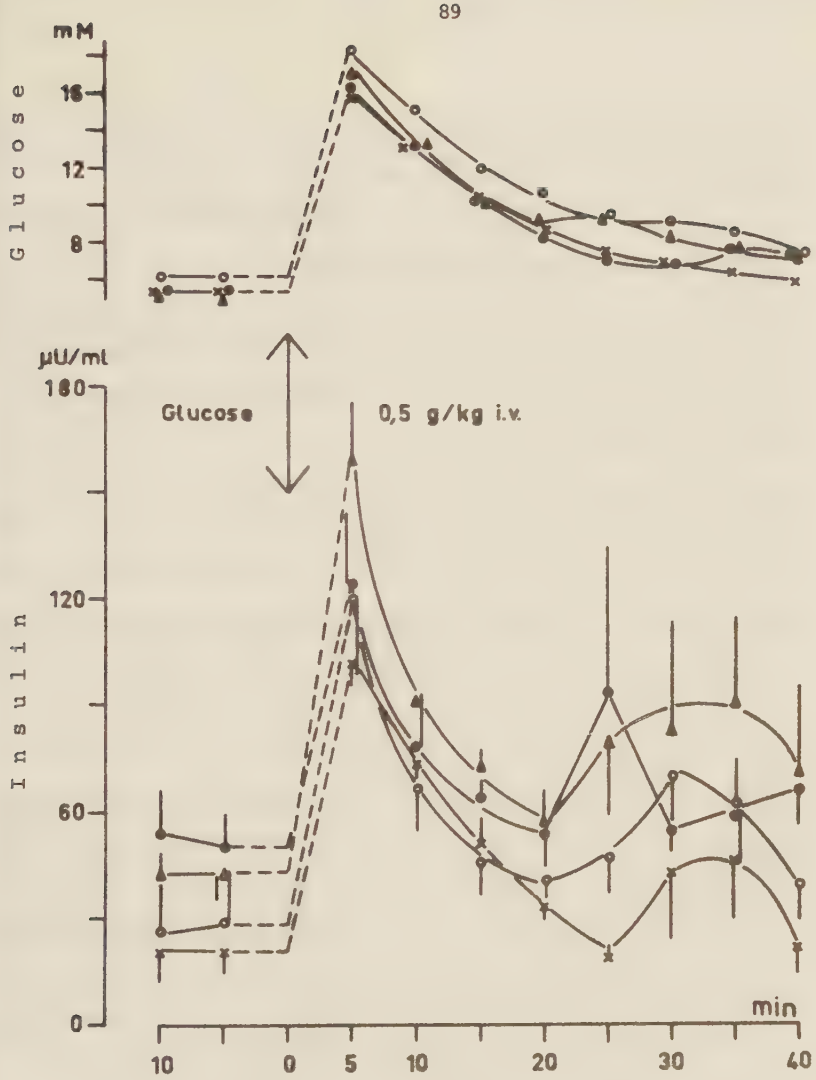

Abb.4.15:
Einfluß von intravenös injiziertem GSH auf die Plasmaspiegel der Glucose und des Insulins während des IVGTT bei der Ratte.

Glucose (0,5 g/kg) wurde als Bolusinjektion zum Zeitpunkt t = 0' i.v. appliziert.
GSH wurde in einer Dosierung von 50 µmol/kg 2 Minuten vor dem Glucosebolus (-Δ-) und von 100 µmol/kg 2 Minuten (-o-) und 5 Minuten (-●-) vor dem Glucosebolus gegeben; Kontrolle: -x-.
Plasmaglucosekonzentrationen: Mittelwerte (SEM nicht gezeigt);
Plasmainsulinkonzentrationen: Mittelwerte +/- SEM; n = 4 / Gruppe.

4.2.1.2.2 Zweite Versuchsserie

In einer zweiten Versuchsserie wurde geprüft, ob die Befunde der obigen Serie bei einer größeren Versuchszahl statistisch abzusichern sind. Da im Vorversuch GSH in einer Dosierung von 50 µmol/kg den besten Effekt zeigte, wurde diese Dosis nochmals getestet. Darüberhinaus wurden 25 µmol GSH /kg eine Minute vor der Glucoseinjektion gegeben. Damit sollte herausgefunden werden, ob kleinere Dosen als 50 µmol/kg eine Wirkung haben.

Die Plasmaspiegel der Glucose und des Insulins sind in Abbildung 4.16 dargestellt. Im Gegensatz zu dem vorherigen Versuch wurde in der zweiten Serie eine Hemmung der ersten Phase der Insulinsekretion durch GSH gefunden. Die Plasmainsulinkonzentrationen 5 Minuten nach Glucoseinjektion sind bei den mit GSH vorbehandelten Gruppen mit 77,6 µU/ml (25 µmol/kg) bzw. 78,6 µU/ml (50 µmol/kg) gegenüber der Kontrollgruppe mit 113,6 µU/ml signifikant erniedrigt ($2p < 0,025$). Erst im weiteren Verlauf werden bei der mit 50 µmol/kg GSH behandelten Gruppe höhere Insulinspiegel gemessen als bei der Kontrollgruppe, während die Insulinspiegel der Gruppe, die 25 µmol/kg GSH erhalten hatte, unterhalb der Kontrollwerte liegen. Die Flächen unter den Plasmainsulinkurven betragen im Mittel 2602 für die Kontroll- und 1986 bzw. 2822 für die mit GSH (25 bzw. 50 µmol/kg) behandelten Gruppen. Diese Unterschiede sind statistisch jedoch nicht signifikant (Tab.4.10).

Die Plasmaglucosekonzentrationen verlaufen bei allen drei Gruppen vollständig parallel. Entsprechend unterscheiden sich auch die K-Werte nicht voneinander (Tab.4.10).

Tab.4.10: Flächen unter den Insulinkurven (5.- 40. Minute) und K-Werte nach i.v.-Injektion von 0, 25 und 50 µmol/kg GSH und intravenöser Glucosebelastung (0,5 g/kg).

GSH-Dosis <µmol/kg>	0	25 (-1')	50 (-2')
AUC Insulin <µU/ml x min>	2601,9+/-386,6	1986,4+/-552,7	2821,7+/-622,4
K-Werte	4,49+/-0,42 (10)	4,61+/-0,24 (7)	4,53+/-0,33 (9)

Mittelwerte +/- SEM, Zahl der Versuche in Klammern.

Statistik: AUC: $F = 0,61 < 3,42$ (= $F_{0,05}$): n.s.

K-Wert: $F = 0,03 < 3,42$: n.s.

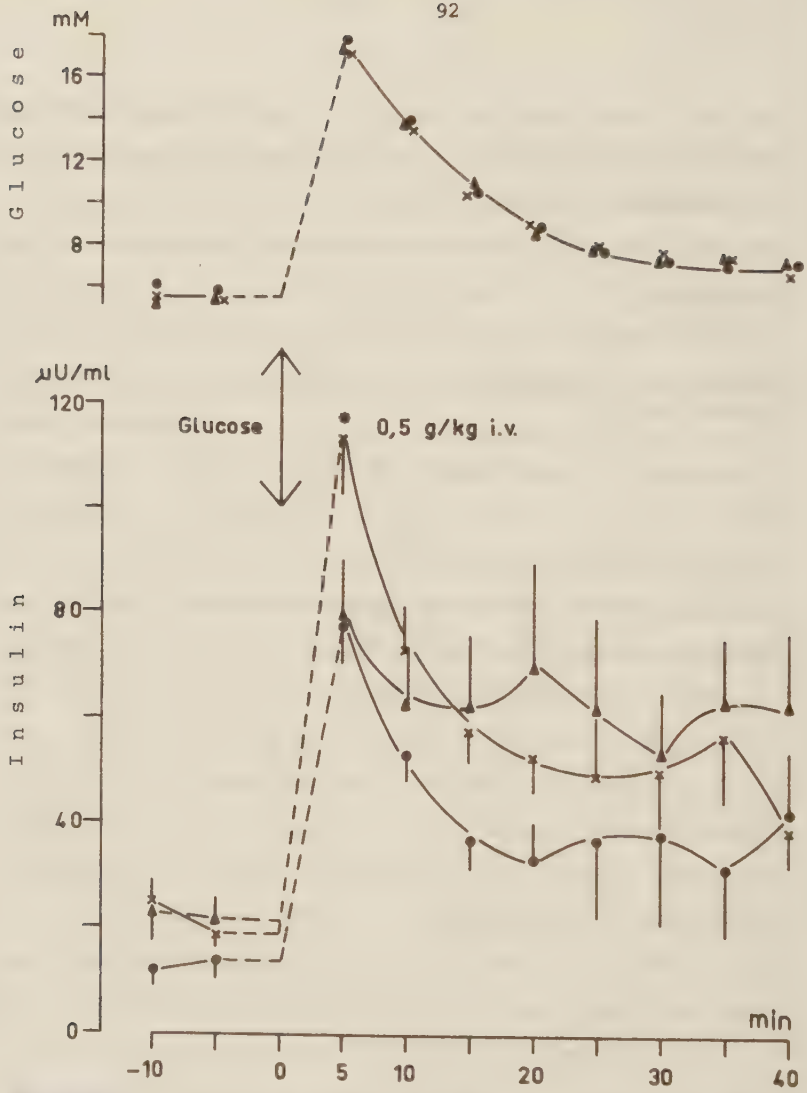

Abb.4.16:
Einfluß von intravenös injiziertem GSH auf die Plasmaspiegel der Glucose und des Insulins während des IVGTT bei der Ratte.

Glucose (0,5 g/kg) wurde als Bolusinjektion zum Zeitpunkt t = 0' i.v. appliziert.
GSH wurde in einer Dosierung von 25 µmol/kg 1 Minute (-●-) und von 50 µmol/kg 2 Minuten (-▲-) vor dem Glucosebolus gegeben; Kontrolle: -x-.
Plasmaglucosekonzentrationen: Mittelwerte (SEM nicht gezeigt);
Plasmainsulinkonzentrationen: Mittelwerte +/- SEM; n = 7-10.
Statistik: * $2p < 0{,}025$.

4.2.3 GSH-Dauerinfusion

Da alle bisherigen Versuche, durch einmalige intravenöse Injektion von GSH die Glucose-stimulierte Insulinsekretion zu beeinflussen, nicht zu einem eindeutigen Ergebnis geführt haben, wurde nun die Art der GSH-Applikation geändert. Möglicherweise wird wegen der sehr schnellen Elimination des GSH nach Bolusinjektion kein ausreichend hoher Wirkspiegel im Gewebe erzielt. Durch kontinuierliche Infusion einer GSH-Lösung kann ein Plasmaspiegel von 0,1 mM GSH jedoch für längere Zeit aufrecht erhalten werden (vgl.4.1.5).

4.2.3.1 IVGTT in Kombination mit GSH-Infusion

Ziel dieser Versuchsreihe war, zunächst durch Infusion von GSH einen relativ konstanten Wirkspiegel herzustellen und dann den Glucosetoleranztest in der bekannten Form durchzuführen.

Dazu wurde den Versuchstieren (weiblichen Ratten mit einem Körpergewicht von 192,5+/-6,7 g (Kontrollgruppe) bzw. 180,5+/-3,0 g (GSH-Gruppe)) zuerst 20 Minuten eine 10-mmolare GSH-Lösung oder eine Krebs-Ringer-Lösung ohne GSH infundiert. Nach dieser Zeit beträgt die GSH-Plasmakonzentration bei den Tieren der GSH-Gruppe ungefähr 0,1 mM. Dann erfolgt die Injektion des Glucosebolus (0,5 g/kg). In den anschließenden 40 Minuten, in denen die Insulin- und Glucosekonzentrationen gemessen werden, steigt der GSH-Spiegel langsam bis auf 0,175 mM.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abbildung 4.17 dargestellt. Die Plasmakonzentrationen an immunoreaktivem Insulin betragen 5 Minuten nach der Injektion des Glucosebolus 118 µU/ml bei der Kontrollgruppe und 91 µU/ml bei den mit GSH behandelten Tieren. Abgesehen vom letzten Meßwert nach 40 Minuten (Kontrolle: 38 µU/ml, GSH-

Gruppe: 54 µU/ml) liegen alle Werte der Kontrollgruppe höher als die Insulinkonzentrationen der Gruppe, der GSH infundiert wurde.

Der Einfluß des GSH auf die radioimmunologische Insulinbestimmung wurde durch Verwendung von Eichkurven korrigiert, die GSH in gleichen Konzentrationen enthielten wie die Proben.

Die Flächen unter den Plasmainsulinkurven betragen im Mittel 2367 für die unbehandelten und 1989 für die mit GSH behandelten Tiere (Tab. 4.11). Trotz der höheren Insulinsekretion bei der Kontrollgruppe, die allerdings statistisch nicht signifikant ist, verläuft die Glucoseelimination bei beiden Gruppen gleich schnell (vgl. K-Werte in Tab. 4.11).

Tab.4.11: IVGTT bei GSH-Dauerinfusion: Flächen unter den Insulinplasmaspiegelkurven (5.- 40. Minute) und K-Werte.

GSH-Infusionsrate	-	0,75 µmol/min
AUC Insulin <µU/ml x min>	2367,3+/-616,4	1989,0+/-279,3
K-Wert	3,35+/-0,29	3,26+/-0,22

Mittelwerte +/- SEM, Zahl der Versuche = 6 pro Gruppe.

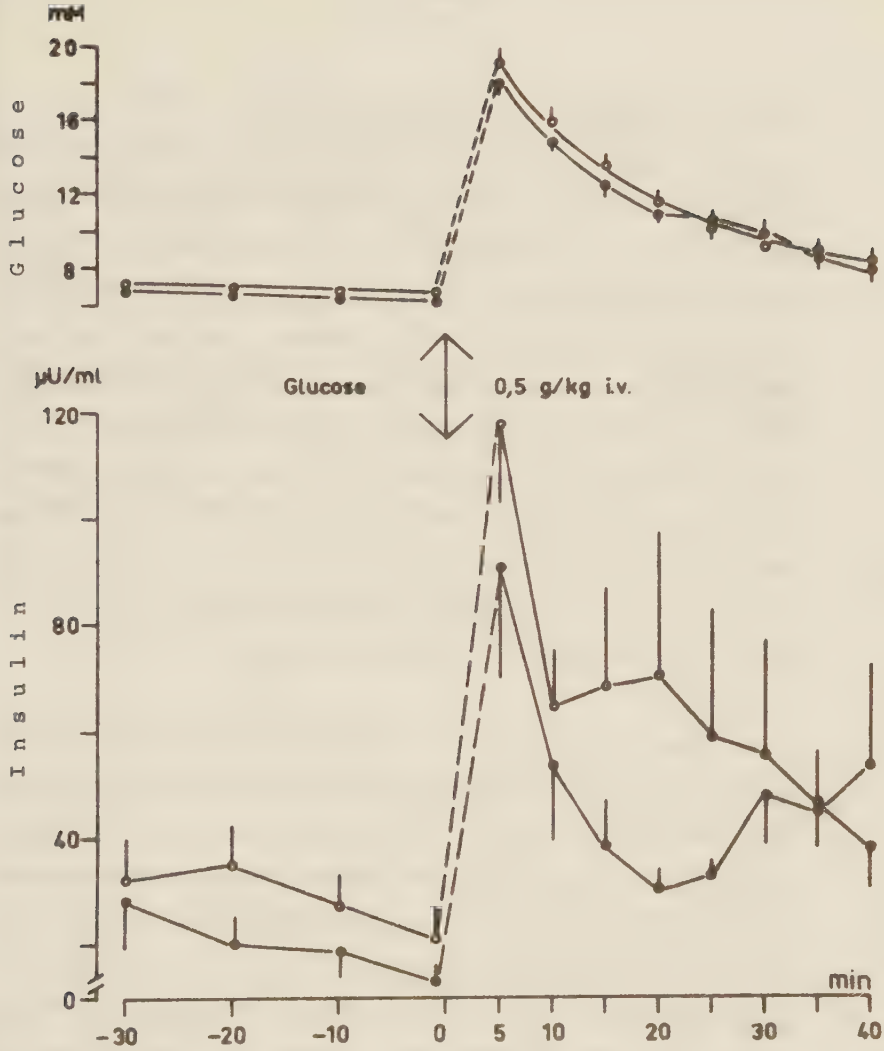

Abb.4.17:
Einfluß von intravenös infundiertem GSH auf die Plasmaspiegel der Glucose und des Insulins während des IVGTT bei der Ratte.

Glucose (0,5 g/kg) wurde als Bolusinjektion zum Zeitpunkt t = 0' i.v. appliziert.
GSH wurde ab dem Zeitpunkt t = -20' als 10-mmolare Lösung mit einer Geschwindigkeit von 75 µl/min infundiert, entsprechend einer Dosis von 0,75 µmol/min (-●-); Kontrolle: -o-.
Plasmaglucose- und Plasmainsulinkonzentrationen: Mittelwerte +/- SEM; n = 6 / Gruppe.

4.2.3.2 Gleichzeitige Infusion von GSH und Glucose

Als Alternative zum Glucosetoleranztest wurde in der folgenden Serie untersucht, ob GSH die durch kontinuierliche Glucosezufuhr stimulierte Insulinsekretion beeinflußt. Mit dieser Versuchsanordnung sollten die in-vitro Bedingungen, unter denen GSH die Insulinsekretion steigert, möglichst genau nachgeahmt werden. Zunächst wird eine 5 %ige (G/V) Glucoselösung mit einer Geschwindigkeit von 75 µl/Minute infundiert. Nach 15 Minuten resultiert eine Plasmaglucosekonzentration von ca. 12 mM, durch welche die Langerhans'schen Inseln zur Sekretion angeregt werden. Dann wird unter Beibehaltung der Glucoseinfusion ein konstanter GSH-Plasmaspiegel durch Infusion erzeugt. Die Tiere der Kontrollgruppe hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von 197,4+/-5,1 g und die mit GSH behandelten Ratten wogen im Mittel 197,4+/-4,6 g.

Das Ergebnis des Versuchs ist in Abbildung 4.18 dargestellt. Die Tiere, die Glucose und GSH erhielten, hatten im Durchschnitt nach Beginn der GSH-Infusion niedrigere Plasmaglucosespiegel als die Tiere der Kontrollgruppe. Ein Vergleich der Flächen unter den Plasmaspiegelkurven zeigt einen sichtbar kleineren Mittelwert bei den mit GSH behandelten Tieren (698 vs. 803; Tab.4.12).

Überraschend ist daher, daß gleichzeitig die Insulinsekretion bei den Ratten, denen GSH infundiert wurde, geringer ist als die der Kontrollgruppe. Die Flächen unter den Insulinspiegelkurven liegen mit 9801 gegenüber 12222 deutlich, statistisch jedoch nicht signifikant unter denen der Kontrolle (Tab.4.12).

Tab.4.12: Flächen unter den Plasmaglucose- und Plasmainsulinkurven (25.- 60. Minute) bei gleichzeitiger Infusion von Glucose und GSH.

Glucoseinfusionsrate	3,75 mg/min	3,75 mg/min
GSH-Infusionsrate	-	0,75 µmol/min
AUC Glucose <mmol/l x min>	802,7+/-31,3	698,3+/-47,1
AUC Insulin < µU/ml x min>	12222+/-1974	9801 +/-1191

Mittelwerte +/- SEM, Zahl der Versuche = 7 pro Gruppe.

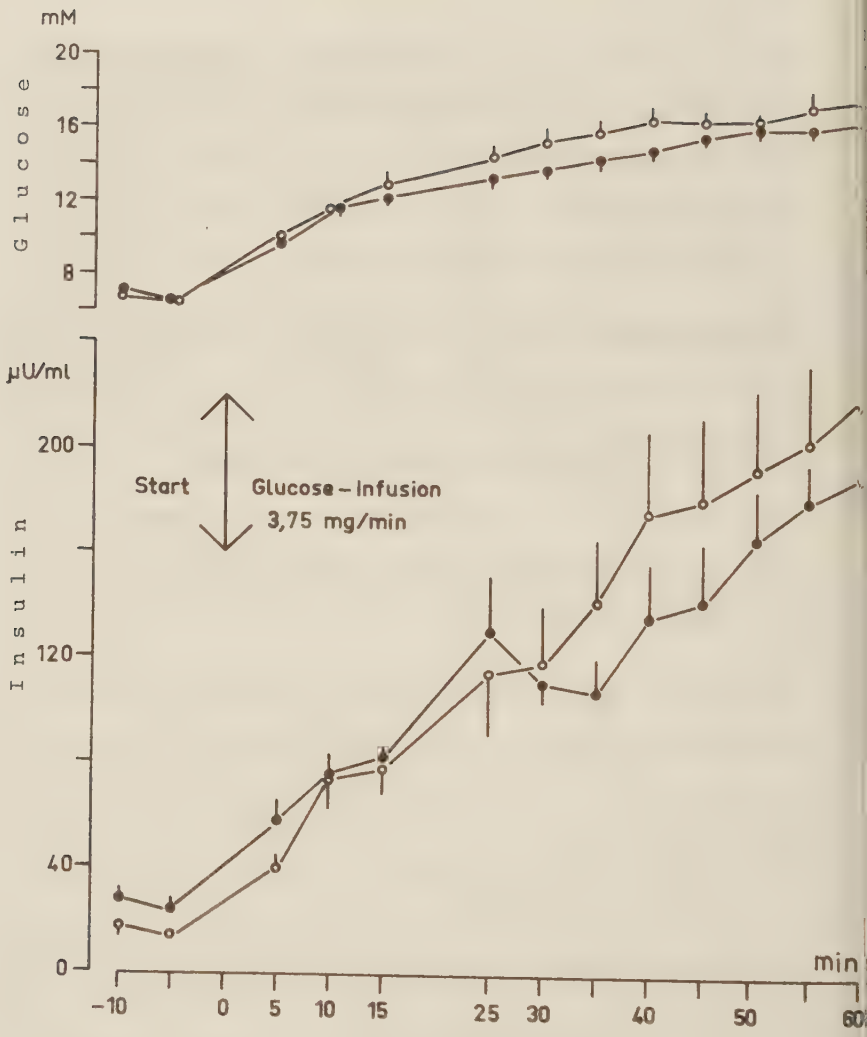

Abb.4.18:
Einfluß von intravenös infundiertem GSH auf die Plasmaspiegel der Glucose und des Insulins der Ratte bei intravenöser Glucosedauerbelastung.

Glucose (3,75 mg/min) wurde als Dauerinfusion ab dem Zeitpunkt t = 0' i.v. appliziert.
GSH wurde ab dem Zeitpunkt t = 15' als 10-mmolare Lösung mit einer Geschwindigkeit von 75 µl/min infundiert, entsprechend einer Dosis von 0,75 µmol/min (–●–); Kontrolle: –o–.
Plasmaglucose- und Plasmainsulinkonzentrationen: Mittelwerte +/- SEM; n = 7 / Gruppe.

4.3 Einfluß von Propylthiouracil auf die Glucosetoleranz und die Insulinsekretion der Ratte in vivo

Kürzlich wurde in unserem Arbeitskreis eine Potenzierung der Glucose-induzierten Insulinsekretion durch Thioharnstoff und dessen Derivate Methylthiouracil, Propylthiouracil und Thiamazol in vitro gefunden (AMMON et al., 1984b). Von den untersuchten Substanzen steigerte Propylthiouracil (PTU) die Insulinsekretion am stärksten.

Im dritten Teil der Arbeit wurde versucht, diesen Effekt des PTU auf die Glucose-stimulierte Insulinsekretion auch in vivo nachzuweisen.

Die Experimente wurden in Form von intravenösen Glucosetoleranztests nach vorheriger oraler Applikation des PTU an weiblichen Ratten durchgeführt. Die Dosierung betrug 50, 100 und 200 mg/kg (entsprechend 0,294, 0,588 und 1,175 mmol/kg).

4.3.1 Einfluß des PTU auf die basalen Plasmainsulin- und Plasmaglucosespiegel

In Anwesenheit substimulatorischer Glucosekonzentrationen (2,8 mM) zeigten in vitro weder PTU noch die anderen Thiouracile einen Effekt auf die Insulinsekretion.

Betrachtet man die Plasmainsulinspiegel 70 Minuten nach oraler Applikation des PTU, so findet man bei den mit PTU behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe höhere Insulinkonzentrationen. Der Unterschied zwischen den Mittelwerten der vier Gruppen ist statistisch gesichert ($p < 0,05$; Tab.4.13). Besonders deutlich ist die Differenz zwischen der Kontrollgruppe mit 5,3 µU/ml und der Gruppe, die 200 mg /kg PTU erhielt, mit 30,2 µU/ml ($2p < 0,005$).

Die Plasmaglucosespiegel unterscheiden sich zu diesem Zeitpunkt nicht.

Tab.4.13: Plasmainsulin- und Plasmaglucosespiegel 70 Minuten nach Applikation des PTU.

PTU-Dosis <mg/kg>	0	50	100	200
IRI < µU/ml>	5,3+/-3,5 A	16,8+/-2,9 B	15,6+/-4,1 C	30,2+/-8,5 D
Glucose <mM>	6,13+/-0,16	6,55+/-0,12	6,35+/-0,26	6,37+/-0,09

Mittelwerte +/- SEM, n = 6 pro Gruppe.

Statistik:

Insulin: Varianzanalyse: $F = 3,75 > 3,10$ (=F0,05): $p < 0,05$

t-Test: AB, AC: n.s.; AD: $2p < 0,005$.

Glucose: Varianzanalyse: $F = 1,00 < 3,10$: n.s.

4.3.2 Einfluß des PTU auf die Plasmainsulinspiegel nach intravenöser Glucosebelastung

Abbildung 4.19 zeigt den Effekt der drei verwendeten PTU-Dosen auf den Verlauf der Plasmainsulinspiegel nach i.v.-Injektion eines Glucosebolus (0,5 g/kg). Die Insulinsekretion wird durch PTU dosisabhängig gesteigert. Die maximalen Insulinkonzentrationen treten 5 Minuten nach Glucoseinjektion auf. Sie betragen im Mittel 75 µU/ml für die Kontrollgruppe und 139, 175 bzw. 196 µU/ml für die mit 50, 100 bzw. 200 mg/kg PTU behandelten Gruppen. Nach 35 Minuten hat der Insulinspiegel

bei allen Gruppen wieder den Basislevel erreicht.

Am besten veranschaulichen die Flächen unter den Insulinkurven die dosisabhängige Potenzierung der Sekretion (Tab.4.14). Durch Vorbehandlung mit PTU werden sie von 1501 (Kontrolle) über 2051 und 3611 bis auf 4019 gesteigert. Da die Varianzen innerhalb der einzelnen Gruppen unterschiedlich groß sind, wurden zur statistischen Auswertung die dekadischen Logarithmen der Werte verwendet.

Anhand der transformierten Werte kann die Steigerung durch 100 und 200 mg/kg PTU statistisch gesichert werden ($2p < 0,025$ bzw. $< 0,02$).

4.3.3 Einfluß des PTU auf die Glucoseelimination nach intravenöser Glucosebelastung

Parallel zur Steigerung der Insulinsekretion bewirkt PTU eine Verbesserung der Glucosetoleranz. Die Elimination der Glucose aus dem Plasma wird durch PTU dosisabhängig beschleunigt (Abb.4.20).

In Einzelfällen wurden bei Tieren, die 100 oder 200 mg/kg PTU erhalten hatten, in der letzten Phase des Glucosetoleranztests Hypoglykämien beobachtet.

Zur Auswertung des Verlaufs der Plasmaglucosespiegel wurden die K-Werte berechnet. Sie betragen 3,75 für die Kontrollgruppe und 4,15, 5,40 bzw. 5,52 für die Tiere, die 50, 100 bzw. 200 mg/kg PTU erhalten hatten. Zur statistischen Prüfung wurden die logarithmisch transformierten Werte genommen. Die Steigerung des K-Werts durch 100 und 200 mg/kg PTU ist signifikant ($2p < 0,02$ bzw. $< 0,01$).

Tab.4.14: Einfluß des PTU auf die Flächen unter den Plasmainsulinkurven nach intravenöser Glucosebelastung (0,5 g/kg).

PTU-Dosis <mg/kg>	0	50	100	200
AUC Insulin < µU/ml x min>	1501+/-200	2051+/-214	3611+/-931	4019+/-985
log	3,157±0,058 A	3,292±0,046 B	3,501±0,111 C	3,513±0,138 D

Mittelwerte +/- SEM, n = 6 pro Gruppe.

Statistik (logarithmierte Werte):
Varianzanalyse: F = 3,33 > 3,10 (= F0,05): p < 0,05.
t-Test: AB: n.s.; AC: 2p < 0,025; AD: 2p < 0,02.

Tab.4.15: Einfluß des PTU auf die Glucoseeliminationsgeschwindigkeitsraten (K-Werte) nach intravenöser Glucosebelastung (0,5 g/kg).

PTU-Dosis <mg/kg>	0	50	100	200
K-Wert	3,75+/-0,26	4,15+/-0,21	5,40+/-0,68	5,52+/-0,63
log	0,569±0,032 A	0,615±0,022 B	0,717±0,051 C	0,730±0,043 D

Mittelwerte +/- SEM, n = 6 pro Gruppe.

Statistik (logarithmierte Werte):
Varianzanalyse: F = 4,12 > 3,86 (= F0,025): p < 0,025.
t-Test: AB: n.s.; AC: 2p < 0,02; AD: 2p < 0,01.

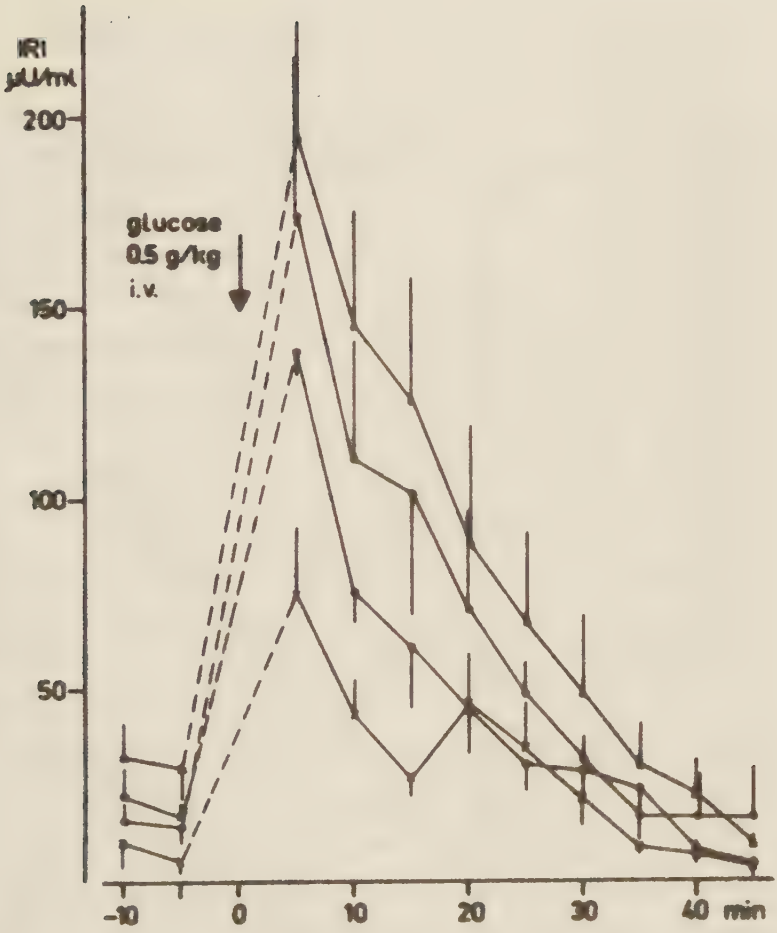

Abb.4.19:
Einfluß von oral appliziertem Propylthiouracil auf die Plasmainsulinspiegel der Ratte während des IVGTT.

Glucose (0,5 g/kg) wurde als Bolus zum Zeitpunkt t = 0' i.v. gegeben. Propylthiouracil wurde in Dosen von 0 (-x-), 50 (-●-), 100 (-○-) und 200 mg/kg (-▲-) 75 Minuten vor der Glucoseinjektion oral appliziert. Plasmainsulinkonzentrationen: Mittelwerte +/- SEM, n = 6 / Gruppe.

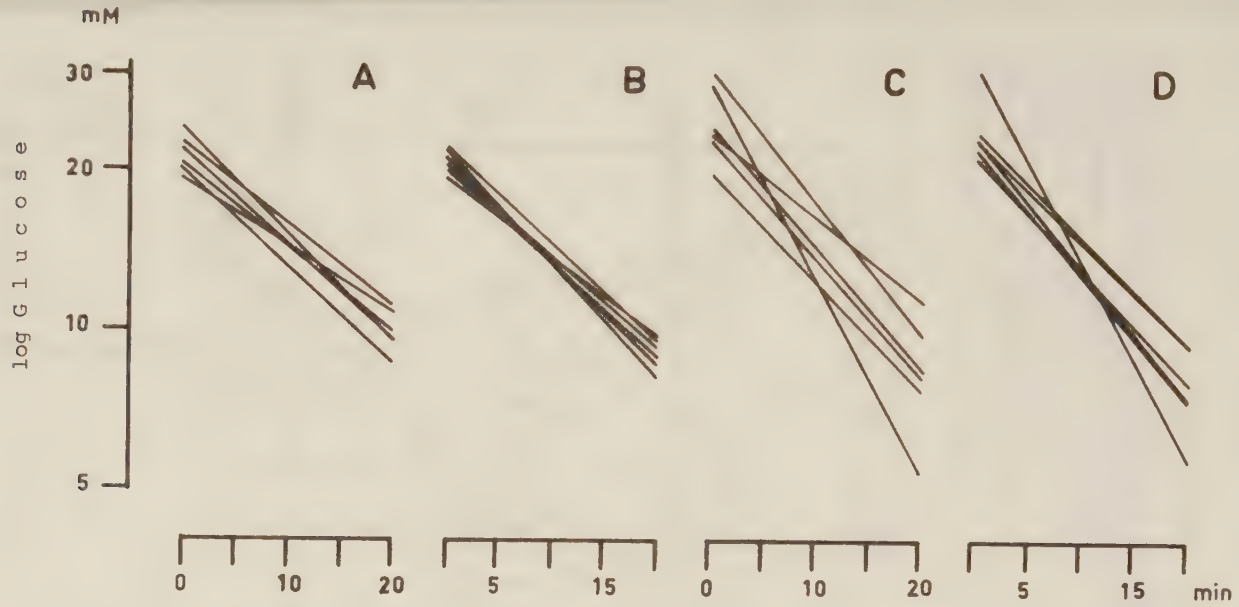

Abb.4.20:
Einfluß von oral appliziertem Propylthiouracil auf die Elimination der Glucose aus dem Plasma von Ratten während des IVGTT.

Glucose (0,5 g/kg) wurde zum Zeitpunkt t = 0' i.v. gegeben.
Die Applikation des PTU erfolgte p.o. 75 Minuten vor der Glucoseinjektion in Dosen von 0 (A), 50 (B), 100 (C) und 200 (D) mg/kg Körpergewicht.
Die entsprechenden K-Werte betragen im Mittel: 3,75 (A), 4,15 (B), 5,40 (C) und 5,52 (D).

5 DISKUSSION

5.1 Pharmakokinetische Eigenschaften des reduzierten Glutathions bei der Ratte

5.1.1 Glutathionplasmaspiegel der Ratte

Die in der Literatur angegebenen Werte für die physiologischen Glutathionplasmakonzentrationen von Ratten differieren stark, sowohl was den Gesamtglutathiongehalt als auch was den Oxidationsgrad des Glutathions angeht. Die Ursachen für die abweichenden Daten liegen einmal in verschiedenen Techniken der Blutgewinnung. Es hat sich gezeigt, daß die Glutathionkonzentrationen in einzelnen Blutgefäßen unterschiedlich groß sind. Der höchste GSH-Gehalt wurde in Plasma, welches aus Lebervenen entnommen wurde, gefunden, da die Leber viel GSH freisetzt, der niedrigste im Plasma renaler Venen, weil die Niere GSH weitgehend extrahiert (ANDERSON & al., 1980).

Weiter ist von Bedeutung, ob die Blutproben von narkotisierten oder nicht narkotisierten Ratten entnommen wurden. Arterielles Plasma von anästhesierten Tieren enthält nur 60 % der Glutathionmenge, die im Plasma von nicht narkotisierten Ratten gefunden wird (ANDERSON & al., 1980). Schließlich spielen auch methodische Probleme bei der Aufarbeitung der Blutproben eine Rolle. Von großer Bedeutung ist, daß die Proben schnell aufgearbeitet und gemessen werden. Bei sofortiger Bestimmung des Glutathiongehaltes wurden beispielsweise von ANDERSON & MEISTER (1980) 25 µM Gesamtglutathion gefunden, 15 % davon in oxidierter Form; nach einstündigem Stehenlassen bei 23 °C hatte das Plasma nur noch einen Gehalt von 7,5 µM (zu 95 % GSSG).

Man kann davon ausgehen, daß die physiologische Plasmakonzentration

Tab.5.1: Glutathiongehalt im Plasma von Ratten. Eine Übersicht über die in der Literatur angegebenen und die eigenen Daten.

	Gesamtglutathion* <µM>	GSSG* <µM>	in %	GSH <µM>	Blutgewinnung	Narkose	Autor
	4,9	-	-	-	Herzpunktion	?	TIETZE, 1969
	3,1	-	-	-	A. femoralis	ja	BARTOLI & al., 1978
	3,9	2,0	53	1,9	A. femoralis	ja	HÄBERLE & al., 1979
	4,6	-	-	-	Herzpunktion	ja	CYKRIT, 1979
a)	24,8	3,8	15	21,0	Dekapitation	nein	ANDERSON &
b)	7,5	7,1	95	0,4	dto.	nein	MEISTER, 1980
	26,0	5,0	19	21,0	V. hepatica	ja	ANDERSON
	14,5	2,7	19	11,8	Aorta	ja	&
	2,6	0,5	19	2,1	V. renalis	ja	al.,
	8,1	2,6	32	5,5	V. cava inf.	ja	1980
	9,9	2,5	25	7,4	A. carotis	ja	eigene Daten

Alle Glutathionbestimmungen wurden mit der DTNB-Reductase-Methode durchgeführt.
*: Gesamtglutathion und GSSG sind in GSH-Äquivalenten angegeben.
a) bei sofortiger Bestimmung, b) nach einstündigen Stehenlassen bei 23 °C.

der Ratte unter Normalbedingungen mindestens 25 µM Glutathion, überwiegend in Form von GSH, beträgt; Plasma von Mäusen enthält sogar fast 40 µM Glutathion (GRIFFITH, 1980).

In der Tabelle 5.1 sind die aus der Literatur ersichtlichen Glutathionplasmakonzentrationen von Ratten den selbst ermittelten Daten gegenübergestellt. Die eigenen Ergebnisse stimmen mit den von ANDERSON & al. (1980) unter ähnlichen Bedingungen (arterielles Plasma von narkotisierten Ratten) gefunden Werten recht gut überein.

5.1.2 Oxidation des reduzierten Glutathions im Plasma

Die Abbildungen 4.1 - 4.6 zeigen, daß intravenös appliziertes GSH im Plasma schnell zu GSSG oxidiert wird. Wie aus der zeitabhängigen Abnahme des GSH/GSSG-Quotienten (Abb.4.7) ersichtlich ist, kommt es zu einer Kumulation des oxidierten Glutathions. Diese Anreicherung des GSSG könnte durch die unterschiedliche Reaktivität von GSH und GSSG im Plasma bedingt sein.

In-vitro-Untersuchungen ergaben, daß GSSG, welches dem Plasma zugesetzt wird, nur sehr langsam mit einer Rate von 0,1 µM/min aus dem Plasma verschwindet. Dagegen nimmt die Konzentration des GSH im Rattenplasma rasch ab. Zugesetztes GSH wird unter den in-vitro-Bedingungen zur Hälfte zu GSSG oxidiert. Ein kleiner Teil bindet an Plasmaproteine, und der Rest reagiert zu solchen Derivaten, die aufgrund der hohen Spezifität der Glutathionreductase-DTNB-Cycling-Methode nicht bestimmt werden. Vermutlich handelt es sich um gemischte Disulfide oder Thioether mit einem ähnlichen Molekulargewicht wie GSSG (ANDERSON & MEISTER, 1980).

Eine schnelle Oxidation des GSH findet auch in anderen extrazellulären Flüssigkeiten statt, zum Beispiel in der Gallenflüssigkeit (EBERLE &

al., 1981). Wie in der Niere geschieht die GSH-Oxidation vermutlich auch im Plasma durch nichtenzymatische Wasserstoffübertragung zwischen GSH und Cystinylbisglycin (vgl. Abb.1.5), dessen Vorkommen im (Human-)Plasma nachgewiesen wurde (ARMSTRONG, 1979).

5.1.3 Abbau des Glutathions in vivo

Der Abbau des Plasmaglutathions in physiologischer Konzentration erfolgt zu etwa zwei Dritteln in der Niere und zu einem Drittel durch gamma-Glutamyltranspeptidasen anderer Organe, z.B. des Dünndarms (GRAFSTRÖM & al., 1981). Im Plasma selbst wurde keine gamma-GTP-Aktivität gefunden. Selbst wenn die Glutathionplasmakonzentration durch Infusion von GSH oder GSSG bis auf 600 µM gesteigert wird, ist die Niere für den größten Teil des Glutathionabbaus verantwortlich. Sie besitzt auch unter diesen Bedingungen noch die Kapazität, 60 - 70 % des Glutathions während einer Nierenpassage aus dem Plasma zu extrahieren (HÄBERLE & al., 1979).

Fünf Minuten nach i.v.-Injektion von 10 µmol (14)C-Glycin-markiertem GSH oder GSSG findet man, wie autoradiographische Studien von HAHN & al. (1978) an Ratten zeigen, eine Akkumulation der Radioaktivität in der Niere. Anschließend folgt eine Redistribution der Radioaktivität, insbesondere in die Leber. Eine Aufnahme von markiertem Glutathion in das Gewebe wurde nicht beobachtet. Sämtliche im Gewebe gefundene Radioaktivität wurde als markiertes Glycin identifiziert. Die Autoren folgerten aus ihren Befunden, daß intravenös injiziertes Glutathion durch einen raschen Abbau aus dem Blut entfernt wird.

Die eigenen Ergebnisse sprechen ebenfalls für einen schnellen Metabolismus des GSH. Sowohl nach intravenöser Injektion als auch bei Infusion von GSH steigt die Konzentration der löslichen DTNB-reaktiven

Thiole im Plasma deutlich an (Abb.4.3-4.6, 4.8). Diese Zunahme anderer (Nicht-GSH-)Thiole ist zumindest zum Teil auf ein Erscheinen thiolhaltiger Abbauprodukte des GSH im Plasma zurückzuführen. Es handelt sich vermutlich einmal um Cystein, welches bei der Spaltung des GSH freigesetzt wird. Zum anderen könnte durch die GSH-Applikation eine vermehrte Bildung von gamma-Glutamylcystein induziert werden. Gamma-Glutamylcystein entsteht durch Übertragung der gamma-Glutamylgruppe des Glutathions auf Cystein (GRIFFITH & al., 1981) und kommt unter basalen Bedingungen in etwa der gleichen Konzentration wie GSH im Plasma vor (HAGENFELDT & al., 1978).

5.1.4 Pharmakokinetische Parameter des GSH bei der Ratte

In der Arbeit von HAHN und Mitarbeitern (1978) ist die Abnahme der Radioaktivität im Blut von Ratten dargestellt, denen ca. 90 µmol/kg (14)C-markiertes GSH intravenös injiziert wurde. Die Elimination zeigt einen biphasischen Verlauf und stimmt - soweit hier ein qualitativer Vergleich möglich ist - mit dem bei Verwendung einer ähnlichen Dosis (100 µM/kg) selbst ermittelten Kurvenverlauf des Gesamtglutathions in Abbildung 4.2 überein.

Bei Mäusen wurde die Halbwertszeit des Gesamtglutathions nach intravenöser Injektion von GSH bestimmt. Sie beträgt 1,9 Minuten bei normalen Tieren. Bei Mäusen mit Diät-bedingtem Glutathionmangel wurde eine verlängerte Halbwertszeit (4,9 Minuten) gefunden (WENDEL & JAESCHKE, 1982).

Ein ähnlicher Wert (1,6 Minuten) wurde nach i.v.-Injektion von 100 mg GSH beim Menschen berechnet (WENDEL & CIKRYT, 1980).

In Übereinstimmung damit ergab die Auswertung der Plasmaspiegelkonzentrationen des GSH bei der Ratte in Abhängigkeit von der verwendeten

Dosis Halbwertszeiten zwischen 1,7 und 2,8 Minuten für die Verteilungsphase (Abb.4.9a).
Die Halbwertszeiten der Eliminationsphase sind dagegen erheblich länger und mit der GSH-Dosis invers korreliert. Sie liegen zwischen 52 und 11 Minuten (Abb.4.9b).
Korrespondierend zu der mit steigender Dosis kürzer werdenden Eliminationshalbwertszeit nimmt die Rate, mit der GSH aus dem Plasma entfernt wird (Plasmaclearance) dosisabhängig zu (Abb.4.12).

Interessante Aspekte liefert auch die Betrachtung der ermittelten Verteilungskoeffizienten des GSH. Diese Koeffizienten werden um so kleiner, je höher die injizierte GSH-Dosis ist. Dies deutet darauf hin, daß die Verteilung des GSH bei hohen Dosen schlechter ist als bei niedrigen. Auch der Quotient der Verteilungsgeschwindigkeitskonstanten (k12/k21), der ein Maß für die Gewebepenetration darstellt, wird um so kleiner, je mehr GSH appliziert wird (Tab.4.3).
Die Konsequenz aus diesen Ergebnissen ist, daß mit einer hohen Dosierung des GSH nicht entsprechend hohe Wirkspiegel im Gewebe erzielt werden können.

5.2 Einfluß von reduziertem Glutathion auf die Insulinsekretion der Ratte in vivo und in vitro

5.2.1 Effekte von exogenem GSH auf Zellen verschiedener Gewebe

Die Bedeutung des intrazellulären Glutathions der B-Zelle für die Insulinsekretion wurde unter 1.1.2 ausführlich geschildert.
Inwieweit man durch Zufuhr von exogenem GSH den intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten beeinflussen kann, sei es durch Aufnahme des GSH-Moleküls als Ganzes in die Zelle, oder sei es durch extrazelluläre Spal-

tung des GSH, Absorption der konstitutionierenden Aminosäuren und verstärkte Resynthese des GSH in der Zelle, ist an Langerhans'schen Inseln noch nicht untersucht worden.

Bei der Perfusion von Rattenleber mit radioaktiv markiertem GSH, GSSG, Cystein, Glycin oder Glutamat wurde eine rasche Permeation der einzelnen Aminosäuren in die Leberzellen beobachtet, Glutathion jedoch wurde weder in reduzierter noch in oxidierter Form aufgenommen (HAHN & al., 1978). In vivo konnte durch i.v.-Injektion von GSH bei Mäusen ein durch eiweißfreie Diät erzeugter, erniedrigter GSH-Spiegel der Leber zwar normalisiert werden, eine Steigerung eines normalen Leber-GSH-Levels gelang dagegen nicht. Erstgenannter Effekt wird durch Butathionsulfoximin, einen Inhibitor der GSH-Biosynthese, gehemmt, was darauf hindeutet, daß exogenes GSH nicht als solches in die Zelle aufgenommen wird, sondern nur die Aminosäuren für die intrazelluläre Biosynthese liefert (WENDEL & JAESCHKE, 1982). Ganz entsprechende Beobachtungen wurden von JENSEN & MEISTER (1982) an Lymphocyten gemacht.

Die Perfusion von Kaninchen-Cornea mit GSH-haltigem Medium führt zu einem Anstieg der GSH-Spiegel der Hornhautepithelzellen (WHIKEHART & EDELHAUSER, 1978).

Abgesehen von den geschilderten Effekten auf die intrazellulären GSH-Level, welche von Zelle zu Zelle unterschiedlich sein mögen, sind auch Wechselwirkungen von exogenem GSH mit Thiolgruppen der Zellmembran möglich. An Erythrocyten wurde die Spaltung von gemischten Disulfiden der Zellmembran vom Typ Protein-SSG durch GSH berichtet (HAEST & al., 1981). Ein Teil der Disulfidgruppen von Proteinen der Erythrocytenmembran wird durch GSH in SH-Gruppen übergeführt (KOSOWER & al., 1982).

An isolierten Langerhans'schen Inseln von Ratten wurden neben der

Steigerung der Glucose-stimulierten Insulinsekretion Effekte von exogenem GSH auf den Rubidiumefflux und die Calciumaufnahme gezeigt. Der Efflux des (86)Rb(+) wird durch GSH gehemmt, allerdings nur durch eine hohe Konzentration von 10 mM und in Abwesenheit von Glucose (HENQUIN, 1980). Die Aufnahme von (45)Ca(2+) wurde durch 0,1 mM GSH in Anwesenheit von 3 und 16,7 mM Glucose gesteigert (STRÖLIN, 1983).

5.2.2 Unterschiede zwischen in-vitro und in-vivo-Versuchen mit GSH

In vitro wird die Glucose-induzierte Insulinsekretion isolierter Langerhans'scher Inseln der Ratte durch 0,1 mM GSH (HELLMAN & al., 1975a) und die des isoliert-perfundierten Rattenpankreas durch 1 mM GSH gesteigert (AMMON & ABDEL HAMID, 1981).

Bei den in dieser Arbeit beschriebenen in-vivo-Versuchen konnte weder durch rasche intravenöse Injektion (Abb.4.16) noch durch Dauerinfusion von GSH (Abb.4.17, 4.18) in der verwendeten Dosierung ein positiver Effekt auf die Glucosetoleranz und die Insulinsekretion der Ratte festgestellt werden.

Das Ausbleiben des Effekts könnte folgende Ursachen haben:

1. Ein nicht ausreichender Wirkspiegel am Zielorgan.
2. Ein durch GSH beschleunigter Abbau des freigesetzten Insulins.
3. Eine Insulin-ähnliche Wirkung des GSH.

Die genannten Punkte sollen nachfolgend ausführlich erörtert werden.

5.2.2.1 Wirkspiegel des GSH an der Langerhans'schen Insel

Aus den gemessenen GSH-Plasmaspiegeln kann nur bedingt auf die GSH-Konzentration in den verschiedenen Geweben zurückgeschlossen werden. Autoradiographische Studien mit einem (99)Tc-GSH-Komplex ergaben eine ähnlich hohe Anreicherung der Radioaktivität im Pankreas von Ratten

wie in der Niere und eine fünffach höhere Anreicherung als in der Leber 30 Minuten nach i.v.-Injektion (ERCAN & al., 1978). Ein (65)Zn-GSH-Komplex wird in Pankreata von Mäusen stärker als in Leber und Niere angereichert, bei Ratten dagegen in einem geringeren Maße (ERCAN, 1981).

Die genannten Metall-GSH-Komplexe haben vermutlich jedoch vom freien GSH abweichende pharmakokinetische Eigenschaften.

Die selbst ermittelteten pharmakokinetischen Parameter deuten darauf hin, daß die Gewebepenetration des GSH mit steigender Dosis abnimmt. Dadurch wird wahrscheinlich die Erzeugung eines hohen GSH-Wirkspiegels im Pankreas und in anderen Geweben erschwert.

Die Frage, welche Wirkspiegel des GSH an den Langerhans'schen Inseln des Pankreas nach intravenöser Gabe vorgelegen haben, kann zufriedenstellend nur durch entsprechende Messungen beantwortet werden.

5.2.2.2 Beschleunigung des Insulinabbaus durch GSH

Der Abbau des Insulins erfolgt stufenweise. Zunächst werden die Disulfidbrücken des Moleküls durch GSH unter Katalyse des Enzyms Glutathion-Insulin-Transhydrogenase (Thiol : Protein-Disulfid-Oxidoreductase; GIT) gespalten, anschließend erfolgt die Proteolyse der entstandenen A- und B-Ketten (VARANDI & al., 1972).

Studien an Ratten zeigten eine ubiquitäre Verbreitung der GSH-Insulin-Transhydrogenase, die in allen untersuchten Organen nachweisbar ist, beispielsweise in Milz, Niere, Lunge, Darm, Herz, Muskel- und Fettgewebe. Die höchsten Aktivitäten befinden sich in der Leber und im Pankreas (CHANDLER & VARANDI, 1972). Die GSH-Insulin-Transhydrogenase der Leber spaltet Insulin sowohl in hohen ("pharmakologischen") als auch in physiologischen Konzentrationen (VARANDI, 1973b). Lokalisiert

ist das Enzym größtenteils in den Mikrosomen der Leberzellen (VARANDI, 1973a), es kommt aber auch in der Plasmamembran vor (VARANDI, 1973c). In isolierten Langerhans'schen Inseln von Ratten wurde GIT gleichfalls gefunden (KOHNERT & al., 1974, 1976); menschliche Insulinomzellen enthalten eine inaktive Form des Enzyms (VARANDI, 1974).

Auch in Bestandteilen des Bluts sind GSH-Insulin-Transhydrogenase-Aktivitäten nachgewiesen worden, und zwar in Leukocyten (CHANDLER & al., 1974) und in Erythrocyten (BRODAL, 1971).

Von besonderem Interesse für die Beurteilung der eigenen Versuche sind Befunde von UETE & al. (1976), wonach Plasma von Ratten eine GSH-abhängige Insulin-abbauende Aktivität entwickelt, sobald die physiologisch sehr niedrigen Plasma-GSH-Spiegel durch Zugabe von exogenem GSH erhöht werden.

Diese in-vitro-Beobachtung könnte möglicherweise eine Erklärung dafür sein, warum bei uns in vivo die Plasmainsulinspiegel von Ratten, die GSH erhalten hatten, niedriger sind als bei den unbehandelten Tieren, solange gleichzeitig ein erhöhter GSH-Plasmaspiegel vorliegt. Bei rascher intravenöser Injektion von GSH (50 µmol/kg) liegen die GSH-Plasmakonzentrationen innerhalb der ersten fünf Minuten nach dem Glucosebolus zwischen 0,1 und 0,05 mM. Die zu diesem Zeitpunkt meßbaren Plasmainsulinkonzentrationen sind signifikant niedriger als die der Kontrolle. Erst im weiteren Versuchsverlauf, wenn GSH größtenteils aus dem Plasma eliminiert ist, erreichen sie das Niveau der unbehandelten Tiere (Abb.4.16). Bei Dauerinfusion von GSH, wo während der gesamten Versuchsdauer GSH-Konzentrationen von 0,1 - 0,2 mM im Plasma vorliegen, sind im Durchschnitt alle Insulinmeßwerte niedriger als bei den Kontrolltieren (Abb.4.17, 4.18).

5.2.2.3 Insulinähnliche Wirkung von Thiolen

Obwohl bei den Ratten, denen GSH appliziert wurde, nach intravenöser Glucosebelastung niedrigere Plasmainsulinspiegel als bei den Kontrolltieren gefunden wurden, wies ihre Glucosetoleranz keine Unterschiede zu den unbehandelten Ratten auf. Die beim IVGTT ermittelten K-Werte waren annähernd identisch, und bei Glucoseinfusion lagen die resultierenden Glucoseplasmaspiegel trotz geringerer Insulinplasmakonzentrationen bei den Tieren, denen GSH infundiert wurde, niedriger als bei den Kontrolltieren. Scheinbar benötigen also die mit GSH behandelten Tiere weniger Insulin zur Elimination der Glucose als die unbehandelten Ratten.

Dieses überraschende Ergebnis könnte möglicherweise mit den im Folgenden beschriebenen in-vitro-Befunden im Zusammenhang stehen.

Verschiedene Untersucher haben gezeigt, daß niedermolekulare Thiole wie GSH oder L-Cystein an isolierten Fettzellen eine Insulin-ähnliche Wirkung haben (LAVIS & WILLIAMS, 1970; CZECH & FAIN, 1972; CZECH & al., 1974a; OLEFSKY, 1979; MAY, 1980). LAVIS & WILLIAMS berichteten 1970 erstmals, daß Cystein, GSH, 2-Mercaptoethanol und Dithiothreitol in einem Konzentrationsbereich von 0,01 - 1 mM in gleicher Weise wie Insulin dosisabhängig die Lipolyse in Adipocyten hemmen und die Glucoseoxidation steigern. Der stimulatorische Effekt von Cystein und GSH auf die Glucoseutilisation der Fettzellen ist abhängig von der Anwesenheit von Kupfer(II)-Ionen (CZECH & FAIN, 1972).

Bei der Oxidation von Thiolen durch Sauerstoff, welche von Cu(2+) katalysiert wird, entsteht Wasserstoffperoxid. H_2O_2 vermittelt den Effekt niedermolekularer Thiole auf die Glucoseoxidation und die Lipolyse (CZECH & al., 1974a). Die Wirkung des H_2O_2 beruht einerseits auf einer Stimulation des Hexosetransportsystems der Fettzelle (CZECH &

al., 1974b). Ähnlich wie Insulin, welches an seinen Rezeptor gebunden hat, bewirkt H_2O_2 die Oxidation bestimmter kritischer SH-Gruppen der Plasmamembran von Adipocyten (CZECH & al., 1974c). Diese Sulfhydryl-oxidation von Membranproteinen führt das Hexosetransportsystem von einer inaktiven (reduzierten) Form mit niedriger Vmax in eine aktive (Disulfid-)Form mit hoher Vmax über (CZECH, 1976).
Andererseits stimuliert exogenes Wasserstoffperoxid die intrazelluläre Oxidation von Format zu CO_2 durch das Enzym Katalase (MAY & DE HAEN, 1979). Derselbe Effekt wird auch durch Insulin ausgelöst: Insulin führt in Fettzellen zur Produktion von endogenen H_2O_2 und steigert die Format-Oxidation durch die H_2O_2-abhängige Katalase, welche wiederum mit dem Glucosemetabolismus gekoppelt ist (MUKHERJEE & al., 1978). Endogen produziertes H_2O_2 hat demnach möglicherweise die Funktion eines "second messenger" für die Wirkung des Insulins auf Adipocyten (MAY & DE HAEN, 1979).

Nachdem die eigenen Untersuchungen eine relativ rasche Oxidation des intravenös applizierten GSH zum Disulfid erkennen lassen, und man ferner davon ausgehen kann, daß im Blut der Ratten sowohl Sauerstoff als auch $Cu^{(2+)}$ (an Albumin gebunden) vorhanden sind, erscheint die Bildung von Wasserstoffperoxid bei der GSH-Oxidation in vivo durchaus möglich zu sein. Entstandenes H_2O_2 könnte eine gesteigerte Glucose-aufnahme in das Fettgewebe bewirken. Das hätte wiederum zur Folge, daß ein möglicherweise verstärkter Insulinabbau durch eine Insulin-ähnliche Wirkung des GSH kompensiert werden könnte, woraus im Endeffekt eine unveränderte Glucosetoleranz resultieren würde.

5.3 Pharmakologische Effekte des Propylthiouracils in vitro und in vivo

5.3.1 Wirkungen an der Schilddrüse

Propylthiouracil (PTU) gehört zusammen mit anderen Thioharnstoffderivaten wie zum Beispiel Methylthiouracil (MTU), Methylmercaptoimidazol (MMI) oder Carbimazol zu den als Thyreostatika therapeutisch genutzten Substanzen. Ihre Wirkung beruht auf der Hemmung der Synthese der Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) auf der Stufe der Jodisation, also der Hemmung des Einbaus von Jod in Tyrosylgruppen des Thyreoglobulins.

Aufgrund von in-vitro-Studien von TAUROG (1976) sind für Thioharnstoffderivate in der Schilddrüse zwei Wirkungsmechanismen denkbar:

1. In einem bestimmten Konzentrationsbereich konkurrieren Thioharnstoffverbindungen wie PTU mit Jodidionen um die Substratbindungsstelle der thyreoidalen Peroxidase (TPO). TPO oxidiert unter Verwendung von Wasserstoffperoxid Jodidionen und aktiviert sie dadurch für den Einbau in Tyrosin. Bei hohen Konzentrationen von Thiouracilen oder in Abwesenheit von Jodid geht die reversible in eine irreversible Hemmung der TPO über.

2. Aktiviertes Jod reagiert bei Anwesenheit von Thioharnstoffen bevorzugt mit diesen und nicht mit seinem physiologischen Substrat, dem Tyrosin. Es kommt daher hauptsächlich zur Oxidation der Thiouracile zu Disulfiden und nicht zur Bildung von jodierten Tyrosinderivaten.

In vivo steht offenbar dieses Abfangen von aktiviertem Jod durch Thioharnstoffe bei der Jodisationshemmung im Vordergrund (DAVIDSON & al., 1978).

Das folgende Schema veranschaulicht die beschriebenen Effekte:

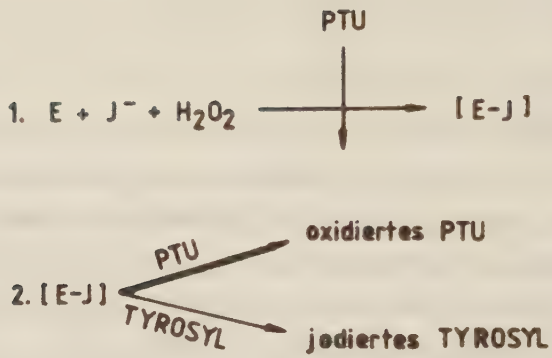

Abb.5.1:
Schematische Darstellung der Jodisationshemmung durch PTU.
(nach TAUROG, 1976)
1. Hemmung des Bildung von aktiviertem Jod (<E-J>). In vitro verläuft diese Hemmung in Abhängigkeit von dem Konzentrationsverhältnis Thiouracil : Jodid reversibel oder irreversibel.
2. Reaktion des aktivierten Jod mit Thioharnstoffderivaten. Dieser Reaktionsweg ist gegenüber der Jodierung von Tyrosylgruppen bevorzugt.

Eine weitere Wirkung des PTU besteht in der Hemmung der Aktivität der thyreoidalen Adenylatcyclase und der Phospholipogenese. PTU hemmt sowohl die basale als auch die durch Thyreotropin (TSH) stimulierte Aktivität der Adenylatcyclase und unterscheidet sich in diesem Punkt von MMI, welches die basale Aktivität des Enzyms erhöht (PAHUJA & al., 1978).

5.3.2 Hepatoprotektive Wirkung des PTU

Im Tierexperiment kann Propylthiouracil die Auslösung einer Lebernekrose durch verschiedene chemische Noxen verhindern. So treten beispielsweise bei Ratten die durch Ethanol (ISRAEL & al., 1975), Tetra-

chlorkohlenstoff (ORREGO & al., 1976) oder Paracetamol (LINSCHEER & al., 1980) induzierten Leberschäden nach einer Vorbehandlung der Tiere mit PTU in einem wesentlich geringen Grade als bei den unbehandelten Tieren oder gar nicht auf.

Untersuchungen zum Mechanismus dieses hepatoprotektiven Effekts im Falle des Paracetamol (= Acetaminophen) ergaben bei den mit PTU behandelten Ratten einen gegenüber den Kontrolltieren signifikant erhöhten GSH-Spiegel in der Leber (LINSCHEER & al., 1980). In einer anschließenden Studie (RAHEJA & al., 1982) wurde eine dritte Gruppe von Ratten gleichzeitig mit PTU und T3 behandelt. Bei diesen Tieren wurden zwar eher geringere Leber-GSH-Spiegel gemessen als bei der Kontrolle, die protektive Wirkung gegen Paracetamol war jedoch in dieser Gruppe genauso vorhanden wie bei den Tieren, die nur PTU erhalten hatten. Die Autoren folgerten daraus: 1. PTU steigert nicht direkt den GSH-Level der Leber, vielmehr ist dieser Effekt als Folge der durch PTU ausgelösten Hypothyreose anzusehen. 2. Die Leberschutzwirkung des PTU beruht nicht allein auf einer Steigerung des GSH-Spiegels.

YAMADA & KAPLOWITZ (1980) zeigten, daß PTU in vitro GSH als Substrat der GSH-S-Transferase ersetzen kann. Dieses Enzym vermittelt u.a. die Konjugation des toxischen Paracetamol-Metaboliten mit GSH. Auch bei in-vivo-Untersuchungen an Mäusen wurde die Bildung eines Konjugates zwischen PTU und Paracetamol nachgewiesen. Der protektive Effekt des PTU gegenüber der Lebertoxizität des Paracetamol beruht demnach offenbar auf einer direkten chemischen Reaktion mit dem reaktiven Metaboliten des Paracetamol, wodurch die kovalente Bindung dieses Metaboliten an Makromoleküle und die dadurch ausgelöste Leberzellschädigung verhindert wird (YAMADA & al., 1981).

5.3.3 Effekte des PTU auf die Glucosetoleranz und die Insulinsekretion

5.3.3.1 Effekte bei chronischer Gabe von PTU

Es existieren eine Reihe von tierexperimentellen Untersuchungen, die sich mit dem Einfluß einer chronischen Applikation von Propylthiouracil auf die Insulinsekretion beschäftigen.

LENZEN & al. (1976) fanden bei der Pankreasperfusion von Ratten, die zuvor 14 Tage PTU mit der Nahrung erhalten hatten, eine signifikante Steigerung der durch Glucose (16,7 mM) stimulierten Insulinsekretion.

Die Plasmainsulinspiegel von Ratten waren während einer Dauerbehandlung mit PTU innerhalb der ersten Behandlungswoche signifikant höher als die der Kontrolle, nach zweieinhalb Wochen lagen sie auf demselben Niveau und im weiteren Verlauf niedriger als die der unbehandelten Tiere (JOLIN & al., 1970). Eine 30-tägige PTU-Applikation im Futter führte bei Ratten zu einer leicht verminderten Insulinsekretion nach Glucosebelastung, die Glucosetoleranz war nicht beeinflusst (JOLIN & MONTES, 1974).

Die beschriebenen Effekte können jedoch nur teilweise als eine direkte Wirkung des PTU auf die Insulinsekretion angesehen werden. Eine große Bedeutung ist der durch chronische Gabe von PTU ausgelösten Hypothyreose beizumessen. Sieht man die oben geschilderten Ergebnisse gemeinsam mit den folgenden Befunden, so wird der Zusammenhang zwischen dem Schilddrüsenhormonstatus und der Ansprechbarkeit der Langerhans'schen Inseln auf Glucosestimulation deutlich.

So werden zum Beispiel bei Hunden, die durch Injektion von (131)J hypothyreot gemacht wurden, deutlich erhöhte Plasmainsulinspiegel beim IVGTT gefunden. Ihre Glucosetoleranz ist vermindert (RENAULD & al., 1972). Bei Ratten werden nach Behandlung mit den Thyreostatika MMI oder MTU verschlechterte Glucosetoleranzen beobachtet (VOSS & al.,

1974). Entsprechende klinische Untersuchungen zeigen bei Myxödem-Patienten nach intravenöser Glucosebelastung eine verlangsamte Glucoseelimination sowie eine verminderte Ansprechbarkeit gegenüber exogenem Insulin (ELRICK & al., 1961) bzw. erhöhte Insulinplasmaspiegel (ANDREANI & al., 1970). Auch nach Stimulation mit Arginin findet man bei hypothyreoten Patienten höhere Plasmainsulinkonzentrationen (SEINO & al., 1974).

Die Verschlechterung der Glucosetoleranz im Status der Hypothyreose hat demnach ihre Ursache nicht in einer verminderten Insulinfreisetzung, sondern in einer Insulinresistenz infolge einer anhaltenden Hypersekretion von Insulin. Histologische Untersuchungen an Ratten ergaben, daß eine Behandlung mit MTU zu einer B-Zellhypertrophie und einer partiellen Degranulation führt (RUDY & DYBAN, 1963).

Im Gegensatz dazu ist die Insulinsekretion von hyperthyreoten Ratten bei Glucosestimulation vermindert (LENZEN & al., 1975, 1976). Auch Hunde, die T4 erhalten haben, zeigen während des Glucosetoleranztests eine geringere Insulinfreisetzung. Die K-Werte entsprechen dabei denen der euthyreoten Kontrolltiere (RENAULD & al., 1971). Erst bei massiver Glucosezufuhr (Glucoseinfusionstest) wird eine geschwächte Glucosetoleranz sichtbar (RENAULD & al., 1974). Bei Patienten mit Schilddrüsenüberfunktion liegen die Plasmainsulinspiegel und die K-Werte nach intravenöser Glucosebelastung im Normbereich (ELRICK & al., 1961; ANDREANI & al., 1970).

Möglicherweise wird durch die Blutspiegelkonzentration der Schilddrüsenhormone T3 und T4 die Funktion der alpha- und beta-Rezeptoren der B-Zelle und damit deren Reaktion auf Glucosestimulation moduliert (OKAJIMA & UI, 1978).

5.3.3.2 Akute Effekte des PTU auf die Insulinsekretion

In unserem Labor konnte gezeigt werden, daß Thioharnstoff und seine Derivate MTU, PTU und Thiamazol eine direkte Wirkung auf isolierte Langerhans'sche Inseln der Ratte haben. In dem untersuchten Konzentrationsbereich (0,8 - 5,6 mM) wird die durch 11,1 mM Glucose stimulierte Insulinsekretion von allen vier Substanzen dosisabhängig gesteigert. In Anwesenheit einer substimulatorischen Glucosekonzentration (2,8 mM) kann dagegen keine Insulinfreisetzung ausgelöst werden. Der quantitative Vergleich der in-vitro-Daten ergibt, daß Propylthiouracil von den getesteten Verbindungen die stärkste Wirkung hat (AMMON & al., 1984b).

Wie Abbildung 4.19 zeigt, wird durch PTU auch in vivo die Sekretion von Insulin dosisabhängig gesteigert.

Die basalen Insulinplasmaspiegel der mit PTU behandelten Ratten sind gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Diese Steigerung ist jedoch nur bei der höchsten verwendeten Dosis (200 mg/kg) statistisch gesichert. Dieser Befund stimmt gut überein mit Messungen von JOLIN & MONTES (1974): 10 Minuten nach intraperitonealer Injektion von 30 mg/kg PTU waren die Plasmainsulinkonzentrationen von Ratten gegenüber unbehandelten Tieren bereits signifikant erhöht und stiegen im Verlauf von 90 Minuten weiter bis auf 60 µU/ml. Parallel dazu beobachteten die Autoren ein Absinken der Blutglucosespiegel.

Die nach intravenöser Glucosebelastung resultierenden Plasmainsulinspiegel werden durch PTU ebenfalls deutlich und dosisabhängig gesteigert. Dieser Effekt, verglichen auf der Basis der Flächen unter den Plasmainsulinkurven, ist bei einer Dosierung von 100 und 200 mg/kg PTU p.o. statistisch signifikant (Tab.4.14).

Gleichzeitig mit der Erhöhung des Insulins im Plasma werden die Gluco-

seeliminationsgeschwindigkeitskonstanten (K-Werte) durch PTU gesteigert (Abb.4.20).

Im Gegensatz zu den unter 5.3.3.1 geschilderten Effekten, die vermutlich größtenteils auf der thyreostatischen Wirkung des PTU beruhen, scheinen die Befunde von JOLIN & MONTES (1974) und die eigenen Ergebnisse eine direkte Beeinflussung der Langerhans'schen Inseln durch PTU wiederzuspiegeln. Die genannten Autoren zeigten, daß es unter ihren Versuchsbedingungen (10 - 120 Minuten nach i.p.-Injektion von 30 mg/kg PTU) nicht zu einer Abnahme, sondern zu einer leichten Zunahme des Schilddrüsenhormonspiegels im Plasma kommt.

Zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus der Thiouracile in der B-Zelle bedarf es weiterer Studien. Betrachtet man die Struktur der an der isolierten Langerhans'schen Insel getesteten Substanzen, so ist ihr gemeinsames Merkmal die Thioharnstoffgruppierung. Für die Wirkung scheint es unerheblich, ob diese Komponente Bestandteil eines Pyrimidin- (MTU, PTU) oder Imidazolringsystems (Thiamazol) ist oder isoliert (Thioharnstoff) vorliegt.

In ihrer Wirkung ähneln die Thiouracile anderen thiolhaltigen Substanzen wie GSH, Cystein (AMMON & ABDEL HAMID, 1981) und einer Reihe weiterer SH-Verbindungen (AMMON, unveröffentlicht), welche gleichfalls die Glucose-induzierte Insulinsekretion zu steigern vermögen.

Im Falle des PTU könnte aufgrund der in 5.3.2 beschriebenen Befunde an eine Beeinflussung intrazellulärer Glutathionsysteme gedacht werden. Nachdem bekannt ist, daß PTU mit GSH um die Substratbindungsstelle der GSH-S-Transferasen der Leber konkurriert, erscheint auch ein Einfluß auf GSH-abhängige Enzyme der Langerhans'schen Insel denkbar zu sein.

6 ZUSAMMENFASSUNG

6.1 Zielsetzung

1. Die pharmakokinetischen Eigenschaften des reduzierten Glutathions nach intravenöser Applikation "pharmakologischer" GSH-Dosen bei der Ratte sollten untersucht werden.
2. Auf der Basis der pharmakokinetischen Daten sollte geprüft werden, ob durch Gabe von reduziertem Glutathion in einer geeigneten Form und Dosierung die Glucose-induzierte Insulinsekretion der Ratte in vivo gesteigert werden kann.
3. Ebenfalls an narkotisierten Ratten sollte versucht werden, einen Einfluß des Propylthiouracils auf die Insulinsekretion nach intravenöser Glucosebelastung nachzuweisen.

6.2 Ergebnisse

1. Nach intravenöser Bolusinjektion unterliegt GSH einer raschen Elimination. Die Halbwertszeiten der Verteilungsphase liegen dosisabhängig zwischen 1,7 und 2,8 Minuten, die der Eliminationsphase zwischen 52 und 11 Minuten. Reduziertes GSH wird in vivo sowohl oxidiert als auch in die konstitutionierenden Aminosäuren gespalten.
Ein relativ konstanter GSH-Plasmaspiegel kann nur durch kontinuierliche Infusion einer GSH-Lösung erzeugt werden.
2. In vivo hat reduziertes Glutathion weder bei Injektion noch bei Infusion in den verwendeten Dosierungen einen signifikanten Einfluß auf die Glucosetoleranz und die Glucose-stimulierte Insulinsekretion der Ratte.

3. Die basalen und die nach intravenöser Glucosebelastung resultierenden Insulinplasmaspiegel der Ratte werden durch orale Applikation von Propylthiouracil dosisabhängg gesteigert. Parallel dazu findet man eine beschleunigte Elimination der Plasmaglucose während des intravenösen Glucosetoleranztests.

6.3 Schlußfolgerungen

1. Die Versuche zur Pharmakokinetik haben ergeben, daß die Ratte in der Lage ist, GSH bei einmaliger intravenöser Injektion durch Oxidation und Abbau schnell aus dem zirkulierenden Blut zu entfernen. Aus diesem Grund kann durch diese Applikationsart kein konstanter GSH-Wirkspiegel erzeugt werden. Durch kontinuierliche Infusion einer GSH-Lösung werden die genannten metabolischen Prozesse kompensiert, sodaß ein relativ gleichbleibender GSH-Plasmaspiegel resultiert.
2. Was die Beeinflussung der Glucose-induzierten Insulinsekretion betrifft, so konnten die in vitro erhobenen Befunde am Ganztier nicht bestätigt werden. Die Ursache könnte in der geringen Stabilität des GSH in vivo zu suchen sein. Es ist aber auch eine Induktion des Insulinabbaus durch das GSH-abhängige Enzym GSH-Insulin-Transhydrogenase denkbar.
3. Im Gegensatz dazu konnte die Steigerung der durch Glucose stimulierten Insulinsekretion isolierter Langerhans'scher Inseln durch Propylthiouracil auch im in-vivo-Experiment bestätigt werden. Aufgrund dieses Befundes kann angenommen werden, daß Substanzen vom Typ des Propylthiouracils, deren chemische Struktur eine Thioharnstoffgruppierung enthält, die B-Zellen auch in vivo gegenüber der Insulinfreisetzenden Wirkung der Glucose sensibilisieren können.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Agren, A., Berne, C., Brolin, S.E. (1978):
The activity of glutathione reductase in A2-cell and B-cell-rich pancreatic islets.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 427-429

Allison, R.D., Meister, A. (1981):
Evidence that transpeptidation is a significant function of gamma-glutamyl transpeptidase.
J. Biol. Chem. 256, 2988-2992

Ames, S.R., Elvehjem, C.A. (1945):
Enzymatic oxidation of glutathione.
J. Biol. Chem. 159, 549-562

Ammon, H.P.T., Steinke, J. (1972):
6-Aminonicotinamide (6-AN) as a diabetogenic agent. In vitro and in vivo studies in the rat.
Diabetes 21, 143-148

Ammon, H.P.T. (1975):
Effect of tolbutamide on aminophylline-, 3,5-AMP-dibutyrate- or glucagon-induced insulin release from pancreatic islets after impairment of pyridine nucleotide metabolism caused by 6-aminonicotinamide (6-AN).
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 290, 251-264

Ammon, H.P.T., Verspohl, E. (1976):
Pyridine nucleotides in pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin.
Endocrinology 99, 1469-1476

Ammon, H.P.T., Akhtar, M.S., Niklas, H., Hegner, D. (1977):
Inhibition of p-chloromercuribenzoate- and glucose-induced insulin release in vitro by methylene blue, diamide and tert-butyl hydroperoxide.
Mol. Pharmacology 13, 598-605

Ammon, H.P.T., Verspohl, E.J. (1979):
Effect of methylene blue on pyridine nucleotides and insulin secretion of rat pancreatic islets.
Diabetologia 17, 41-44

Ammon, H.P.T., Akhtar, M.S., Grimm, A., Niklas, H. (1979a):
Effect of methylene blue and thiol oxidants on pancreatic islet GSH/GSSG ratios and tolbutamide mediated insulin release in vitro.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 307, 91-96

Ammon, H.P.T., Hoppe, E., Akhtar, M.S., Niklas, H. (1979b):
Effect of leucine on the pyridine nucleotide contents of islets and on the insulin released - interactions in vitro with methylene blue, thiol oxidants, and p-chloromercuribenzoate.
Diabetes 28, 593-599

Ammon, H.P.T., Grimm, A., Lutz, S., Wagner-Teschner, D., Händel, M., Hagenloh, I. (1980):
Islet glutathione and insulin release.
Diabetes 29, 830-834

Ammon, H.P.T., Abdel Hamid, M. (1981):
Potentiation of the insulin-releasing capacity of tolbutamide by thiols: studies on the isolated perfused pancreas.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 317, 262-267

Ammon, H.P.T., Hoppe, E., Eujen, R., Lutz, S. (1981):
Effect of leucine on GSH levels of rat pancreatic islets.
Horm. Metab. Res. 13, 60-61

Ammon, H.P.T., Hägele, R., Youssif, N., Eujen, R., El-Amri, N. (1983):
A possible role of intracellular and membrane thiols of rat pancreatic islets in calcium uptake and insulin release.
Endocrinology 112, 720-726

Ammon, H.P.T., Abdel Hamid, M., Rao, P.G., Enz, G. (1984a):
Thiol dependent and non thiol dependent stimulations of insulin release.
Diabetes 33 (in press)

Ammon, H.P.T., Pfäffle, T., Melien, M.C.M. (1984b):
Potentiation of glucose-induced insulin release by thiourea and thiourea derivatives. In vitro and in vivo studies.
J. Pharm. Exp. Therap. (in press)

Anderson, M.E., Meister, A. (1980):
Dynamic state of glutathione in blood plasma.
J. Biol. Chem. 255, 9530-9533

Anderson, M.E., Bridges, J., Meister, A. (1980):
Direct evidence for inter-organ transport of glutathione and that the non-filtration renal mechanism for glutathione utilization involves gamma-glutamyl transpeptidase.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 96, 848-853

Andreani, D., Menzinger, G., Fallucca, F., Alberti, G., Tamburrano, G., Cassano, C. (1970):
Insulin levels in thyrotoxicosis and primary myxoedema: response to intravenous glucose and glucagon.
Diabetologia 6, 1-7

Anjaneyulu, K., Anjaneyulu, R., Sener, A., Malaisse, W.J. (1981):
gamma-Glutamyltranspeptidase activity in pancreatic islets.
FEBS Lett. 125, 57-59

Anjaneyulu, K., Anjaneyulu, R., Sener, A., Malaisse, W.J. (1982):
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release.
Thiol: disulfide balance in pancreatic islets.
Biochimie 64, 29-36

Armstrong, M.D. (1979):
The occurrence of cystinylglycin in blood plasma.

Biochim. Biophys. Acta 584, 542-544

Ashcroft, S.J.H., Chatra, L., Weerasinghe, C., Randle, P.J. (1973):
Interrelationship of islet metabolism, adenosine triphosphate content and insulin release.
Biochem. J. 132, 223-231

Ashcroft, S.J.H., Christie, M.R. (1979):
Effects of glucose on the cytosolic ratio of reduced/oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in rat islets of Langerhans.
Biochem. J. 184, 697-700

Ashcroft, S.J.H. (1980):
Glucoreceptor mechanisms and the control of insulin release and biosynthesis.
Diabetologia 18, 5-15

Ashkar, S., Binkley, F., Jones, D.P. (1981):
Resolution of a renal sulfhydryl (glutathione) oxidase from gamma-glutamyltransferase.
FEBS Lett. 124, 166-168

Bannai, S., Tsukeda, H. (1979):
The export of glutathione from human diploid cells in culture.
J. Biol. Chem. 254, 3444-3450

Bartoli, G.M., Sies, H. (1978):
Reduced and oxidized glutathione efflux from liver.
FEBS Lett. 86, 89-91

Bartoli,G.M., Häberle, D., Sies, H. (1978):
Glutathione efflux from perfused rat liver and its relation to glutathione uptake by the kidney.
In: Functions of glutathione in liver and kidney (Eds. Sies, H., Wendel, A.)
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, p. 27-31

Beutler, E., Duron, O., Mikus Kelly, B. (1963):
Improved method for the determination of blood glutathione.
J. Lab. & Clin. Med. 61, 882-888

Bloom, G.D., Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1972):
Effects of organic mercurials on mammalian pancreatic ß-cells.
Biochem. J. 129, 241-254

Brehe, J.E., Burch, H.B. (1976):
Enzymatic assay for glutathione.
Anal. Biochem. 74, 189-197

Brehe, J.E., Chan, A.W., Alvey, T.R., Burch, H.B. (1976):
Effect of methionine sulfoximine on glutathione and amino acid levels in the nephron.
Am. J. Physiol. 231, 1536-1540

Bridges, R.J., Abbott, W.A., Meister, A. (1983):

Renal basolateral metabolism of glutathione (GSH) and gamma-glutamyl amino acids. (Abstract)
Fed. Proc. 42, 2210

Brisson, G.R., Malaisse-Lagae, F., Malaisse, W.J. (1972):
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: VII. A proposed site of action for adenosine-3',5'-cyclic monophosphate.
J. Clin. Invest. 51, 232-241

Brodal, B.P. (1971):
Evidence of an enzymatic degradation of insulin in blood in vitro.
Eur. J. Biochem. 18, 201-206

Capito, K., Hedeskov, C.J. (1976):
Inosine-stimulated insulin release and metabolism of inosine in isolated mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 158, 335-340

Carlberg, I., Mannervik, B. (1975):
Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver.
J. Biol. Chem. 250, 5475-5480

Carlberg, I., Mannervik, B. (1977):
Purification by affinity chromatography of yeast glutathione reductase, the enzyme responsible for the NADPH-dependent reduction of the mixed disulfide of coenzyme A and glutathione.
Biochim. Biophys. Acta 484, 268-274

Chandler, M.L., Varandi, P.T. (1972):
Insulin degradation: II. The widespread distribution of glutathione-insulin transhydrogenase in the tissues of the rat.
Biochim. Biophys. Acta 286, 136-145

Chandler, M.L., Varandi, P.T. (1974):
Insulin degradation: IX. On the presence of glutathione-insulin transhydrogenase in human leukocytes.
Diabetes 23, 232-239

Chang, S.H., Wilken, D.R. (1966):
Participation of the unsymmetrical disulfide of coenzyme A and glutathione in an enzymatic sulfhydryl-disulfide interchange. I. Partial purification and properties of bovine kidney enzyme.
J. Biol. Chem. 241, 4251-4260

Charles, M.A., Fanska, R., Schmid, F.G., Forsham, P.H., Grodsky, G.M. (1973):
Adenosine 3'5'-monophosphate in pancreatic islets: glucose-induced insulin release.
Science 179, 569-571

Cikryt, P. (1979):
Glutathion im Blutplasma.
Diplomarbeit Tübingen

Curthoys, N.P., Rankin, B.B., Wells, W. (1983):
Rat renal extraction and catabolism of glutathione. (Abstract)
Fed. Proc. 42, 2210

Czech, M.P., Fain, J.N. (1972):
Cu(++)-dependent thiol stimulation of glucose metabolism in white fat cells.
J. Biol. Chem. 247, 6218-6223

Czech, M.P., Lawrence, J.C.jr, Lynn, W.S. (1974a):
Evidence for electron transfer reactions involved in the Cu(2+)-dependent thiol activation of fat cell glucose utilization.
J. Biol. Chem. 249, 1001-1006

Czech, M.P., Lawrence, J.C.jr, Lynn, W.S. (1974b):
Hexose transport in isolated brown fat cells. A model system for investigating insulin action on membrane transport.
J. Biol. Chem. 249, 5421-5427

Czech, M.P., Lawrence, J.C.jr, Lynn, W.S. (1974c):
Evidence for the involvement of sulfhydryl oxidation in the regulation of fat cell hexose transport by insulin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4137-4177

Czech, M.P. (1976):
Current status of the thiol redox model for the regulation of hexose transport by insulin.
J. Cell. Physiol. 89, 661-668

Davidson, B., Soodak, M., Neary, J.T., Strout, H.V., Kieffer, J.D., Mover, H., Maloof, F. (1978):
The irreversible inactivation of thyroid peroxidase by methylmercaptoimidazole, thiouracil, and propylthiouracil in vitro and its relationship to in vivo findings.
Endocrinology 103, 871-882

Eberle, D., Clarke, R., Kaplowitz, N. (1981):
Rapid oxidation in vitro of endogenous and exogenous glutathione in bile of rats.
J. Biol. Chem. 256, 2115-2117

Eklöw, L., Thor, H., Orrenius, S. (1981):
Formation and efflux of glutathione disulfide studied in isolated rat hepatocytes.
FEBS Lett. 127, 125-128

Ellman, G.L. (1959):
Tissue sulfhydryl groups.
Archs. Biochem. Biophys. 82, 70-77

Elrick, H., Hlad, C.J., Arai, Y. (1961):
Influence of thyroid function on carbohydrate metabolism and a new method for assessing response to insulin.
J. Clin. Endocrin. Metab. 21, 387-399

Ercan, M.T., Bekdik, C.F., Sarizi, T. (1978):

(99)Tcm-glutathione: labelling and distribution in rats.
Int. J. Appl. Rad. Isot. 29, 697-698

Ercan, M.T. (1981):
(65)Zn-glutathione: Biodistribution and effect of carrier zinc on pancreas uptake.
Int. J. Appl. Rad. Isot. 32, 417-421

Erlichman, J., Schubart, U., Fleischer, N. (1979):
Sulfhydryl reagent-induced insulin release and 45-Ca(2+) fluxes in syrian hamster insulinoma cells.
Endocrinology 105, 1183-1190

Gagliardino, J.J., Harrison, D.E., Christie, M.R., Gagliardino, E.E., Ashcroft, S.J.H. (1980):
Evidence for the participation of calmodulin in the stimulus-secretion coupling in the pancreatic ß-cell.
Biochem. J. 192, 919-927

Glossman, H., Neville, D.M.jr (1972):
gamma-Glutamyltransferase in kidney brush border membranes.
FEBS Lett. 19, 340-344

Grafström, R., Stead, A.H., Orrenius, S. (1980):
Metabolism of extracellular glutathione in rat small-intestinal mucosa.
Eur. J. Biochem. 106, 571-577

Griffith, O.W., Bridges, R.J., Meister, A. (1978):
Evidence that the gamma-glutamyl cycle functions in vivo using intracellular glutathione: effects of amino acids and selective inhibition of enzymes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5405-5408

Griffith, O.W., Novogrodsky, A., Meister, A. (1979):
Translocation of glutathione from lymphoid cells that have markedly different gamma-glutamyl transpeptidase activities.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2249-2252

Griffith, O.W., Meister, A. (1979a):
Translocation of intracellular glutathione to membrane-bound gamma-glutamyl transpeptidase as a discrete step in the gamma-glutamyl cycle: glutathionuria after inhibition of transpeptidase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 268-272

Griffith, O.W., Meister, A. (1979b):
Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5606-5610

Griffith, O.W. (1980):
Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine.
Anal. Biochem. 106, 207-212

Griffith, O.W., Meister, A. (1980):
Excretion of cysteine and gamma-glutamylcysteine moieties in human and

experimental animal gamma-glutamyl transpeptidase deficiency.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3384-3387

Griffith, O.W., Tate, S.S. (1980):
The apparent glutathione oxidase activity of gamma-glutamyl transpeptidase.
J. Biol. Chem. 255, 5011-5014

Griffith, O.W. (1981):
The role of glutathione turnover in the apparent renal secretion of cystine.
J. Biol. Chem. 256, 12263-12267

Griffith, O.W., Bridges, R.J., Meister, A. (1981):
Formation of gamma-glutamylcyst(e)ine in vivo is catalysed by gamma-glutamyl transpeptidase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2777-2781

Grimm, A. (1978):
Glutathion und Insulinsekretion: Mikromethoden zur Bestimmung von reduziertem und oxidiertem Glutathion in Langerhansschen Inseln. Beziehungen zwischen dem GSH/GSSG-Quotienten und glucoseinduzierter Insulinsekretion.
Dissertation, Tübingen

Grodsky, G.M., Bennett, L.L. (1966):
Cation requirements for insulin secretion in the isolated perfused pancreas.
Diabetes 15, 910-912

Häberle, D., Wahlländer, A., Sies, H. (1979):
Assessment of the kidney function in maintenance of plasma glutathione concentration and redox state in anaesthetized rats.
FEBS Lett. 108, 335-340

Haest, C.W.M., Kamp, D., Deuticke, B. (1979):
Formation of disulfide bonds between glutathione and membrane SH groups in human erythrocytes.
Biochim. Biophys. Acta 557, 363-371

Hagenfeldt, L., Arvidsson, A., Larsson, A. (1978):
Glutathione and gamma-glutamylcysteine in whole blood, plasma and erythrocytes.
Clinica Chimica Acta 85, 161-173

Hahn, R., Oberrauch, W. (1978):
Unidirectional transport of reduced glutathione in rat liver and its metabolization in the extracellular space.
in: Functions of glutathione in liver and kidney (Eds. Sies, H., Wendel, A.)
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 32-40

Hahn, R., Wendel, A., Flohe, L. (1978):
The fate of extracellular glutathione in the rat.
Biochim. Biophys. Acta 539, 324-337

Hahn, H.-J., Gylfe, E., Hellman, B. (1980):
Calcium and pancreatic ß-cell function: 7. Evidence for cyclic AMP-induced translocation of intracellular calcium.
Biochem. Biophys. Acta 630, 425-432

Hedeskov, C.J. (1980):
Mechanism of glucose-induced insulin secretion.
Physiol. Rev. 60, 442-509

Heinle, H. (1979):
The degree of glutathione oxidation in excised aortic tissue of rats and rabbits.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1113-1116

Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark, L., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1973):
Role of thiol groups in insulin release: Studies with poorly permeating disulphides.
Mol. Pharmacol. 9, 792-801

Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1974a):
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues: Comparisons of glucose with glyceraldehyde isomers and dihydroxyacetone.
Archs. Biochem. Biophys. 162, 448-457

Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1974b):
Membrane sulphydryl groups and the pancreatic beta cell recognition of insulin secretagogues.
In: Diabetes (Eds. Malaisse, W.J., Pirat, J.)
Excerpta Medica, Amsterdam, p. 65-78

Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1975a):
Stimulation of insulin release by thiols.
Biochim. Biophys. Acta 392, 101-109

Hellman, B., Sehlin, J., Söderberg, M., Täljedal, I.-B. (1975b):
The mechanisms of action of chloromercuribenzene-p-sulphonic acid as insulin secretagogue: Fluxes of calcium, sodium and rubidium in islets exposed to mercurial and a membrane-active antagonist.
J. Physiol. 252, 701-712

Hellman, B., Lernmark, A., Sehlin, J., Söderberg, M., Täljedal, I.-B. (1976):
On the possible role of thiol groups in the insulin-releasing action of mercurials, organic disulfides, alkylating agents, and sulfonylureas.
Endocrinology 99, 1398-1406

Hellman, B., Gylfe, E., Berggren, P.-O., Andersson, T., Abrahamsson, H., Rorsman, P., Betsholtz, C. (1980):
Ca(2+)-transport in pancreatic ß-cells during glucose stimulation of insulin secretion.

Upsala J. Med. Sci. 85, 321-329

Henquin, J.C. (1977):
Tetraethylammonium potentiation of insulin release and inhibition of rubidium efflux in pancreatic islets.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 551-556

Henquin, J.C. (1978):
D-glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islet cells.
Nature 271, 271-273

Henquin, J.C., Meissner, H.P. (1978):
Valinomycin inhibition of insulin release and alteration of the electrical properties of pancreatic ß-cells.
Biochim. Biophys. Acta 543, 455-464

Henquin, J.C. (1980):
Metabolic control of the potassium permeability in pancreatic islet cells.
Biochem. J. 186, 541-550

Henquin, J.C. (1981):
Effects of trifluoperazine and pimozide on stimulus secretion coupling in the pancreatic ß-cells.
Biochem. J. 196, 771-780

Howell, S.L., Tyhurst, M. (1981):
Actomyosin interactions with isolated ß granules. (Abstract)
Diabetologia 21, 284

Howell, S.L., Tyhurst, M. (1982):
Microtubules, microfilaments and insulin secretion.
Diabetologia 22, 301-308

Hughey, R.P., Rankin B.B., Elce, J.S., Curthoys N.P. (1978):
Specifity of a particulate rat renal peptidase and its localization along with other enzymes of mercapturic acid synthesis.
Archs. Biochem. Biophys. 186, 211-217

Isaacs, J., Binkley, F. (1977):
Glutathione dependent control of protein disulfide content by subcellular fractions of hepatic tissue.
Biochim. Biophys. Acta 497, 192-204

Israel, Y., Kalant, H., Orrego, H., Khanna, J.M., Videla, L., Phillips, J.M. (1975):
Experimental alcohol-induced hepatic necrosis: suppression by propylthiouracil.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1137-1141

Jensen, G., Meister, A. (1982)
zitiert nach Meister, A., Anderson, M.E. (1983):
Annual Rev. Biochem. 52, p. 718

Jolin, T., Morreale de Escobar, G., Escobar del Rey, F. (1970):
Differential effects in the rat of thyroidectomy, propylthiouracil

and other goitrogens on plasma insulin and thyroid weight.
Endocrinology 87, 99-110

Jolin, T., Montes, A. (1974):
The different effects of thyroidectomy, KClO4 and propylthiouracil on insulin secretion and glucose uptake in the rat.
Endocrinology 94, 1502-1507

Jones, D.P., Moldeus, P., Stead, A.H., Ormstad, K., Jörnvall, H., Orrenius, S. (1979):
Metabolism of glutathione and a glutathione conjugate by isolated kidney cells.
J. Biol. Chem. 254, 2787-2792

Kohnert, K.-D., Hahn, H.-J., Zühlke, H., Schmidt, S., Fiedler, H. (1974):
Breakdown of exogenous insulin by Langerhans islets of the pankreas in vitro.
Biochim. Biophys. Acta 338, 68-77

Kohnert, K.-D., Jahr, H., Schmidt, S., Hahn, H.-J., Zühlke, H. (1976):
Demonstration of insulin degradation by thiol-protein disulfide oxidoreductase (glutathione-insulin transhydrogenase) and proteinases of pancreatic islets.
Biochim. Biophys. Acta 422, 254-259

Kosower, N.S., Zipser, Y., Faltin, Z. (1982):
Membrane thiol-disulfide status in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells. Relationship to cellular glutathione.
Biochim. Biophys. Acta 691, 345-352

Krausz, Y., Wollheim, C.B., Siegel, E., Sharp, G.W.G. (1980):
Possible role for calmodulin in insulin release: studies with trifluoperazine in rat pancreatic islets.
J. Clin. Invest. 66, 603-607

Kuo, W.N., Hodgins, D.S., Kuo, J.F. (1974):
Regulation by various hormones and agents of adenosine-3'5'-monophosphate levels in islets of Langerhans of rats.
Biochem. Pharmacol. 23, 1387-1391

Lacy, P.E., Howell, S.L., Young, D.A., Fink, C.J. (1968):
New hypothesis of insulin secretion.
Nature 219, 1177-1179

Lash, L.H., Jones, D.P. (1982):
Localization of the membrane-associated thiol oxidase of rat kidney to the basal-lateral plasma membrane.
Biochem. J. 203, 371-376

Lavis, V.R., Williams, R.H. (1970):
Studies of the insulin-like actions of thiols upon isolated fat cells.
J. Biol. Chem. 245, 23-31

Lenzen, S., Panten, U., Hasselblatt, A. (1975):

Thyroxine treatment and insulin secretion in the rat.
Diabetologia 11, 49-55

Lenzen, S., Joost, H.G., Hasselblatt, A. (1976):
Thyroid function and insulin secretion from the perfused pancreas in the rat.
Endocrinology 99, 125-129

Leszczynska, A. (1981):
Effect of reduced glutathione (GSH) on pharmacokinetics and distribution of rifamycin SV in rats.
Biochem. Pharmacol. 30, 71-76

Linscheer, W.G., Raheja, K.L., Cho, C., Smith, N.J. (1980):
Mechanism of the protective effect of propylthiouracil against acetaminophen (Tylenol) toxicity in the rat.
Gastroenterology 78, 100-107

Loo, J.C.K., Riegelman, S. (1968):
New method for calculating the intrinsic absorption rate of drugs.
J. Pharm. Sci. 57, 918-928

Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Mayhew, D. (1967):
A possible role for the adenyl cyclase system in insulin secretion.
J. Clin. Invest. 46, 1724-1734

Malaisse, W.J., Lea, M.A., Malaisse-Lagae, F. (1968):
The effect of mannoheptulose on the phosphorylation of glucose and the secretion of insulin by islets of Langerhans.
Metabolism 17, 126-132

Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Walker, M.O., Lacy, P.E. (1971):
The stimulus-secretion coupling of glucose induced insulin release: V. The participation of a microtubular-microfilamentous system.
Diabetes 20, 257-265

Malaisse, W.J., Hager, D.L., Orci, L. (1972):
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: IX. The participation of the beta cell web.
Diabetes 21 (Suppl. 2), 594-604

Malaisse, W.J. (1973):
Insulin secretion: multifactorial regulation for a single process of release.
Diabetologia 9, 167-173

Malaisse, W.J., Sener, A., Koser, M., Ravazolla, M., Malaisse-Lagae, F. (1977):
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: Insulin release due to glycogenolysis in glucose-deprived islets.
Biochem. J. 164, 447-454

Malaisse, W.J., Hutton, J.C., Kawazu, S., Sener, A. (1978):
The stimulus secretion coupling of glucose-induced insulin release: Metabolic effects of menadione in isolated islets.
Eur. J. Biochem. 87, 121-130

Malaisse, W.J., Hutton, J.C., Kawazu, S., Herchuelz, A., Valverde, I., Sener, A. (1979):
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: XXXV. The links between metabolic and cationic events.
Diabetologia 16, 331-341

Matthews, E.K., Sakamoto, Y. (1975):
Pancreatic islet cells: electrogenic and electrodiffusional control of membrane potential.
J. Physiol. (London) 246, 439-457

May, J.M., De Haen, C. (1979):
Insulin-stimulated intracellular hydrogen peroxide production in rat epididymal fat cells.
J. Biol. Chem. 254, 2214-2220

May, J.M. (1980):
The insulin-like effects of low molecular weight thiols: Role of trace metal contamination of commercial thiols.
Horm. Metab. Res. 12, 587-590

McIntyre, T.M., Curthoys, N.P. (1980):
The interorgan metabolism of glutathione.
Int. J. Biochem. 12, 545-551

McIntyre, T.M., Curthoys, N.P. (1982):
Renal catabolism of glutathione. Characterization of a particulate rat renal dipeptidase that catalyzes the hydrolysis of cysteinylglycine.
J. Biol. Chem. 257, 11915-11921

Meissner, H.P. (1976):
Electrical characterization of the ß-cells in pancreatic islets.
J. Physiol. (Paris) 72, 757-767

Meister, A. (1974):
Glutathione synthesis.
In: The Enzymes (Ed. Boyer, P.B.) 3rd edition, Vol. 10,
Academic Press, New York, p. 671-697

Meister, A., Tate, S.S. (1976):
Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization.
Annual Rev. Biochem. 45, 559-604

Meister A., Tate S.S., Ross, L.L. (1976):
Membrane-bound gamma-glutamyl transpeptidase.
In: The Enzymes of Biological Membranes (Ed. Martonosi, A.) Vol. 3
Plenum Press, New York, p. 315-347

Meister, A. (1981):
On the cycles of glutathione metabolism and transport.
Curr. Top. Cell. Regul. 18, 21-57

Meister, A., Tate, S.S., Griffith, O.W. (1981):
gamma-Glutamyl transpeptidase.

In: Methods in Enzymology (Ed. Jakoby, W.B.) Vol. 77
Academic Press, New York, p. 237-253

Meister, A. (1982):
Metabolism and functions of glutathione: an overview.
Biochem. Soc. Transactions 10, 78-79

Meister, A., Anderson, M.E. (1983):
Glutathione.
Annual Rev. Biochem. 52, 711-760

Montague, W., Cook, J.R. (1971):
The role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in the regulation of insulin release by isolated rat islets of Langerhans.
Biochem. J. 122, 115-120

Montague, W., Howell, S.L., Green, I.C. (1976):
Insulin release and the microtubular system of the islets of Langerhans: Effects of insulin secretagogues on microtubule subunit pool size.
Horm. Metab. Res. 8, 166-169

Mukherjee, S.P., Lane, R.H., Lynn, W.S. (1978):
Endogenous hydrogen peroxide and peroxidative metabolism in adipocytes in response to insulin and sulfhydryl reagents.
Biochem. Pharmacol. 27, 2589-2594

Okajima, F., Ui, M. (1978):
Adrenergic modulation of insulin secretion in vivo dependent on thyroid states.
Am. J. Physiol. 234, E106-E111

Olefsky, J.M. (1979):
Comparison of the effects of insulin and insulin-like agents on different aspects of adipocyte metabolism.
Horm. Metab. Res. 11, 209-213

Ormstad, K., Moldeus, P., Orrenius, S. (1979):
Partial characterization of a glutathione oxidase present in rat kidney plasma membrane fraction.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 497-503

Ormstad, K., Orrenius, S. (1980):
The localization of renal glutathione oxidase activity studied in the isolated, perfused rat kidney.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 92, 540-545

Ormstad, K., Jones, D.P., Orrenius, S. (1980):
Characteristics of glutathione biosynthesis by freshly isolated rat kidney cells.
J. Biol. Chem. 255, 175-181

Ormstad, K., Lastbom, T., Orrenius, S. (1981):
Characteristics of renal glutathione oxidase activity.
FEBS Lett. 130, 239-243

Orrego, H., Carmichael, F.J., Phillips, M.J., Kalant, H., Khanna, J., Israel, Y.: (1976):
Protection by propylthiouracil against carbon tetrachloride-induced liver damage.
Gastroenterology 71, 821-826

Pagliara, A.S., Hover, B.A., Ellerman, J., Matschinsky, F.M. (1975):
Iodoacetate and iodoacetamide-induced alterations of pancreatic alpha- and beta-cell responses.
Endocrinology 97, 698-708

Pahuja, D.N., Ganatra, R.D., Shah, D.H. (1978):
Effect of thionamides on adenyl cyclase activity and phospholipogenesis in rat thyroids.
Biochem. Pharmacol. 27, 487-489

Panten, U., Christians, J., v. Kriegstein, E., Poser, W., Hasselblatt, A. (1973):
Effect of carbohydrates upon fluorescence of reduced pyridine nucleotides from perifused isolated pancreatic islets.
Diabetologia 9, 477-482

Phil, A., Eldjarn, L., Bremer, J. (1957):
On the mode of action of x-ray protective agents. III. The enzymatic reduction of disulfides.
J. Biol. Chem. 227, 339-345

Raheja, K.L., Linscheer, W.G., Chaidong, C., Mahany, D. (1982):
Protective effect of propylthiouracil independent of its hypothyroid effect on acetaminophen toxicity in the rat.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 220, 427-432

Rankin, B.B., McIntyre, Th.M., Curthoys, N.P. (1980):
Brush border membrane hydrolysis of S-benzyl-cysteine-p-nitroanilide, an activity of aminopeptidase M.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 96, 991-996

Rankin, B.B., Curthoys, N.P. (1982):
Evidence for the renal paratubular transport of glutathione.
FEBS Lett. 147, 193-196

Renauld, A., Pinto, J.E.B., Sverdlik, R.C., Foglia, V.G. (1971):
Studies on the effect of hyperthyroidism on the insulin response to hyperglycemia in the dog.
Horm. Metab. Res. 3, 247-251

Renauld, A., Sverdlik, R.C., Andrade, L.L., Rodriguez, R.R. (1972):
Studies on the effect of thyroxine replacement therapy on the increased insulin response to hyperglycemia in the thyroidectomized dog.
Horm. Metab. Res. 4, 373-376

Renauld, A., Andrade, L.L., Sverdlik, R.C., Rodriguez, R.R. (1974):
Serum insulin response to glucose infusion in hyperthyroid dogs.
Horm. Metab. Res. 6, 400-403

Richman, P.G., Meister, A. (1975):
Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione.
J. Biol. Chem. 250, 1422-1426

Ritschel, W.A. (1973):
Angewandte Biopharmazie.
Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft, Stuttgart, S. 108-112

Rudy, R.V., Dyban, A.P. (1963):
Blood sugar level and the islands of Langerhans ß-cell condition following administration of some antithyroidal preparations (6-methylthiouracil, rhodanin, 5-methylrhodanine) and diaboral.
Probl. Endokrin. Gormonoter. (Moskau) 9, 44-50

Schubart, U.K., Erlichman, J., Fleischer, N. (1980):
The role of calmodulin in the regulation of protein phosphorylation and insulin release in hamster insulinoma cells.
J. Biol. Chem. 255, 4120-4124

Schulman, J.D., Goodman, S.I., Mace, J.W., Patrick, A.D., Tietze, F., Butler, E.J. (1975):
Glutathionuria: inborn error of metabolism due to tissue deficiency of gamma-glutamyl transpeptidase.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 68-74

Sehlin, J., Freinkel, N. (1983):
Biphasic modulation of K+ permeability in pancreatic islets during acute stimulation with glucose.
Diabetes 32, 820-824

Seino, Y., Goto, Y., Taminato, T., Ikeda, M., Imura, H. (1974):
Plasma insulin and glucagon responses to arginine in patients with thyroid dysfunction.
J. Clin. Endocrin. Metab. 38, 1136-1140

Sekura, R., Meister, A. (1974):
Glutathione turnover in the kidney; considerations relating to the gamma-glutamyl cycle and the transport of amino acids.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2969-2972

Siegenthaler, W. (Hrsg.) (1973):
Klinische Pathophysiologie.
2. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 70

Sitar, D.S., Thornhill, D.P. (1972):
Propylthiouracil: absorption, metabolism and excretion in the albino rat.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 183, 440-44

Soeldner, J.S., Slone, D. (1965):
Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin using the double antibody technique.
Diabetes 14, 771-779

Spater, H.W., Poruchynsky, M.S., Quintana, N., Masayasu, I., Novikoff,

A.B. (1982):
Immunocytochemical localization of gamma-glutamyltransferase in rat kidney with protein A-horseradish peroxidase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3547-3550

Srivastava, S.K., Beutler, E. (1969):
The transport of oxidized glutathione from human erythrocytes.
J. Biol. Chem. 244, 9-16

Strölin, W. (1983):
Zur Bedeutung von Thiolen für die Aufnahme von Calcium in die Zellen Langerhansscher Inseln von Ratten.
Dissertation, Tübingen

Sugden, M.C., Aschroft, S.J.H. (1978):
Effects of phosphoenolpyruvate, other glycolytic intermediates and methylxanthines on calcium uptake by a mitochondrial fraction from rat pancreatic islets.
Diabetologia 15, 173-180

Sugden, M.C., Ashcroft, S.J.H., Sugden, P.H. (1979a):
Protein kinase activities in rat pancreatic islets of Langerhans.
Biochem. J. 180, 219-229

Sugden, M.C., Christie, M.R., Ashcroft, S.J.H. (1979b):
Presence and possible role of calcium-dependent regulator (calmodulin) in rat islets of Langerhans.
FEBS Lett. 105, 95-100

Sugden, M.C., Ashcroft, S.J.H. (1981):
Cyclic nucleotide phosphodiesterase of rat pancreatic islets. Effects of Ca(2+), Calmodulin and trifluoperazine.
Biochem. J. 197, 459-464

Tate, S.S., Orlando, J. (1979):
Conversion of glutathione to glutathione disulfide, a catalytic function of gamma-glutamyl transpeptidase.
J. Biol. Chem. 254, 5573-5575

Tate, S.S., Grau, E.M., Meister, A. (1979):
Conversion of glutathione to glutathione disulfide by cell membrane bound oxidase activity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2715-2719

Taurog, A. (1976):
The mechanism of action of the thioureylene antithyroid drugs.
Endocrinology 98, 1031-1046

Thor, H., Moldeus, P., Orrenius, S. (1979):
Effect of cysteine, N-acetylcysteine and methionine on glutathione biosynthesis and bromobenzene toxicity in isolated rat hepatocytes.
Archs. Biochem. Biophys. 192, 405-413

Tietze, F. (1969):
Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione.

Anal. Biochem. 27, 502-522

Tomlinson, S., Walker, S.W., Brown, B.L. (1982):
Calmodulin and insulin secretion.
Diabetologia 22, 1-5

Tsao, B., Curthoys, N.P. (1980):
The absolute asymmetry of orientation of gamma-glutamyltranspeptidase and aminopeptidase on the external surface of the rat renal brush border membrane.
J. Biol. Chem. 255, 7708-7711

Uete, T., Shimano, N., Shimizu, S., Morikawa, M. (1976):
Autoregulatory system of insulin degradation in liver: II.
Relationship between blood insulin levels and GSH-dependent insulin degrading activity in liver and blood.
Metabolism 25, 375-384

Umbreit, W.W., Burris, R.H., Stauffer, J.P. (1972):
Manometric and biochemical techniques.
5th edition, Burgess Pub. Co., Minneapolis USA, p. 146

Valverde, I., Vandermeers, A., Anjaneyulu, R., Malaisse, W.J. (1979):
Calmodulin activation of adenylate cyclase in pancreatic islets.
Science 206, 225-227

Valverde, I., Sener, A., Lebrun, P., Herchuelz, A., Malaisse, W.J. (1981):
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release:
XLVII. The possible role of calmodulin.
Endocrinology 108, 1305-1312

Varandi, P.T., Shroyer, L.A., Nafz, M.A. (1972):
Sequential degradation of insulin by rat liver homogenates.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1681-1684

Varandi, P.T. (1973a):
Insulin degradation: V. Unmasking of glutathione-insulin transhydrogenase in rat liver microsomal membrane.
Biochim. Biophys. Acta 304, 642-659

Varandi, P.T. (1973b):
Insulin degradation: VII. Sequential degradation of insulin by rat liver homogenates at physiologic concentrations of insulin and in the absence of exogenous glutathione.
Biochim.Biophys. Acta 320, 249-257

Varandi, P.T. (1973c):
Insulin degradation: X. Identification of insulin degrading activity of rat liver plasma membrane as glutathione-insulin transhydrogenase.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 689-696

Varandi, P.T. (1974):
Insulin degradation in insulinoma: Evidence for the occurrence of an inactive form of glutathione-insulin transhydrogenase and for the absence of insulin A and B chains degrading protease(s).

Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 1119-1126

Verspohl, E.J., Händel, M., Ammon, H.P.T. (1979):
Pentosephosphate shunt activity of rat pancreatic islets: its dependence on glucose concentration.
Endocrinology 105, 1269-1274

Voss, C., Lorenz, C., Ratzmann, L., Hartmann, N. (1974):
Glukosetoleranz und Schilddrüsenfunktion.
Acta Biol. Med. Germ. 33, 515-520

Wendel, A., Cikryt, P. (1980):
The level and half-life of glutathione in human plasma.
FEBS Lett. 120, 209-211

Wendel, A., Jaeschke, H., Gloger, M. (1982):
Drug-induced lipid peroxidation in mice-II. Protection against paracetamol-induced liver necrosis by intravenous liposomally entrapped glutathione.
Biochem. Pharmacol. 31, 3601-3605

Wendel, A., Jaeschke, H. (1982):
Drug-induced lipid peroxidation in mice-III. Glutathione content of liver, kidney and spleen after intravenous administration of free and liposomally entrapped glutathione.
Biochem. Pharmacol. 31, 3607-3611

Whikehart,D.R., Edelhauser, H.F. (1978):
Glutathione in rabbit corneal endothelia: the effects of selected perfusion fluids.
Invest. Ophthal. Visual Sci. 17, 455-464

Williams, I.H., Ashcroft, S.J.H. (1978):
N-acetylglucosamine and the substrate-site hypothesis for the control of insulin biosynthesis and secretion.
FEBS Lett. 87, 115-120

Yamada, T., Kaplowitz, N. (1980):
Propylthiouracil: a substrate for the glutathione S-transferases that competes with glutathione.
J. Biol. Chem. 255, 3508-3513

Yamada, T., Ludwig, S., Kuhlenkamp, J., Kaplowitz, N. (1981):
Direct protection against acetaminophen hepatotoxicity by propylthiouracil.
J. Clin. Invest. 67, 688-695

Zawalich, W.S., Karl, R.C., Ferrendelli, J.A., Matschinsky, F.M. (1975):
Factors governing glucose induced elevation of cyclic 3'5' AMP levels in rat pancreatic islets.
Diabetologia 11, 231-235.

LEBENSLAUF

Matthias Carl Maria Melien

geboren am 23. Juni 1956 in Bielefeld

Vater: Dr. jur. Carl Hermann Melien, Bankdirektor
verstorben am 10. Oktober 1975

Mutter: Marie Friederike Melien, geb. Stüssel

Schulischer Werdegang:

1963 Grundschule in Bielefeld von April 1963 bis November 1966

1966 Besuch des altsprachlichen städtischen Ratsgymnasiums zu Bielefeld von Dezember 1966 bis Juni 1975

1975 Ablegung der Reifeprüfung am 2. Juni 1975

Beruflicher Werdegang:

1975 Immatrikulation an der Tierärztlichen Hochschule Hannover für das Fach Tiermedizin im Oktober 1975

1976 Immatrikulation an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster für das Fach Pharmazie im März 1976
Studium der Pharmazie bis September 1979

1978 1. Abschnitt des Pharmazeutischen Staatsexamens am 17. März

1979 2. Abschnitt des Pharmazeutischen Staatsexamens am 18. September

Pharmaziepraktikum in einer öffentlichen Apotheke
vom 1. Oktober 1979 bis 30. September 1980

1980 3. Abschnitt des Pharmazeutischen Staatsexamens am 28. Oktober in Münster

1980 Erteilung der Approbation als Apotheker am 4. Dezember 1980

Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation im Dezember 1980 am Lehrstuhl für Pharmakologie am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen bei Herrn Prof. Dr. med. H.P.T. Ammon

Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Pharmakologie von Juli 1981 bis August 1982 und am Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie von September 1982 bis Dezember 1983

1983 Abschluß der experimentellen Arbeiten zur Dissertation im Juli.

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon waren die Herren Professoren
K.E. Schulte, J. Reisch, G. Rücker, W. Meyer zu Reckendorf, P. Rohdewald (Pharmazeutische Chemie); Th. Eckert (Pharmazeutische Technologie); H. Friedrich, E. Leistner (Pharmazeutische Biologie und Phytochemie); G. Bornmann (Pharmakologie); W. Ritzerfeld, H. Bösenberg (Medizinische Mikrobiologie); W. Hellenthal (Physik); R. Schöllhorn (allgemeine und anorganische Chemie); H.J. Schäfer (organische Chemie).

Druck und Gesamtherstellung:

DRUCKEREI Dölf 0 70 71 / 3 23 21
7400 Tübingen·Bismarckstr. 92